



TECHNISCHE UNIVERSITÄT  
**CAROLO-WILHELMINA**  
ZU BRAUNSCHWEIG

Metabolismus und Antibiotikaresistenz von  
*Pseudomonas aeruginosa*  
unter simulierten Respirationstraktbedingungen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sabrina Thoma  
aus Alfeld/Leine

1. Referent:	Professor Dr. Dieter Jahn
2. Referent:	Privatdozent Dr. Max Schobert
eingereicht am:	11.11.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am:	15.12.2009

Druckjahr 2009

## **Vorveröffentlichung der Dissertation**

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch Professor Dr. Dieter Jahn, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

## **Publikationen**

Thoma, S. & Schobert M. (2009). An improved *Escherichia coli* donor strain for diparental mating. FEMS Microbiol Lett 294, 127-132.

## **Tagungsbeiträge**

Thoma, S., Hogardt, M. & Schobert, M. Physiological nitrate concentrations promote antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. VAAM Konferenz 2008, Frankfurt/Main, Deutschland.

Thoma, S., Hogardt, M., Römling, U. & Schobert, M. Anaerobic metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* under simulated respiratory conditions. ASM Pseudomonas 2007, Seattle, WA, USA.

Thoma, S. & Schobert, M. Anaerobic metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* under simulated respiratory conditions. VAAM Konferenz 2007, Osnabrück, Deutschland.



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
1.1.1	Aerober Energiemetabolismus .....	1
1.1.2	Anaerober Energiemetabolismus .....	2
1.1.2.1	Denitrifikation .....	2
1.1.2.2	Argininfermentation .....	5
1.1.2.3	Pyruvatfermentation .....	5
1.1.2.4	Regulation des anaeroben Metabolismus .....	6
1.1.3	<i>P. aeruginosa</i> als opportunistisches Pathogen .....	7
1.2	Mukoviszidose .....	8
1.3	Die Rolle von <i>P. aeruginosa</i> in der Mukoviszidose .....	10
1.3.1	Virulenz von <i>P. aeruginosa</i> in der Mukoviszidose-Lunge .....	12
1.3.2	Anpassung von <i>P. aeruginosa</i> in der Mukoviszidose-Lunge .....	13
1.3.3	Multiple Antibiotikaresistenz von <i>P. aeruginosa</i> .....	14
1.3.4	Therapie von <i>P. aeruginosa</i> -Infektionen .....	17
1.4	Artifizielles Sputum-Medium (ASM) .....	17
1.5	Ziele der Arbeit .....	20
2	Material und Methoden .....	21
2.1	Instrumente, Chemikalien und Materialien .....	21
2.1.1	Instrumente .....	21
2.1.2	Chemikalien und Materialien .....	22
2.1.3	Puffer und Lösungen .....	23
2.2	Bakterienstämme, Plasmide und Primer .....	23
2.3	Medien und Medienzusätze .....	27
2.3.1	Medien .....	27
2.3.2	Medienzusätze .....	29
2.4	Mikrobiologische Techniken .....	30
2.4.1	Sterilisation .....	30
2.4.2	Bestimmung der Zelldichte .....	30
2.4.3	Bestimmung der Lebendzellzahl .....	30
2.4.4	Wachstumsbedingungen .....	30
2.4.5	Glycerinkulturen .....	31

2.4.6	Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) .....	31
2.4.7	Test der Antibiotikaresistenz von Koloniebiofilmen .....	31
2.4.8	Durchlässigkeitstest.....	32
2.4.9	Quantifizierung von Pyocyanin.....	32
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.5.1	Isolation und Restriktion genomischer DNA .....	33
2.5.2	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	33
2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.5.4	Sequenzierung .....	34
2.5.5	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	35
2.5.6	Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten .....	36
2.5.7	Ligation von DNA-Fragmenten .....	36
2.5.8	Transformation von <i>E. coli</i> .....	36
2.5.9	Diparentales Mating mit <i>P. aeruginosa</i> .....	37
2.5.10	Mini-Präparation von Plasmid-DNA .....	37
2.5.11	Konstruktion von Deletionsmutanten.....	38
2.5.11.1	Konstruktion einer <i>hemA</i> -Mutante in <i>E. coli</i> S17 .....	38
2.5.11.2	Konstruktion von <i>P. aeruginosa</i> -Deletionsmutanten.....	41
2.5.12	Entfernen von Resistenzkassetten aus dem Genom .....	42
2.5.13	Komplementation und Identifikation einer Mutation durch Transfer einer Genbank in <i>P. aeruginosa</i> .....	43
2.5.14	Gezielte Komplementation eines Gens .....	44
2.6	Transkriptomanalysen mittels <i>P. aeruginosa</i> GeneChips® .....	44
2.6.1	Lösungen und Puffer .....	45
2.6.2	Präparation der RNA für die Transkriptomanalyse.....	47
2.6.3	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	48
2.6.4	Elektrophoretische Auftrennung der RNA.....	48
2.6.5	Aufbereitung der RNA für die GeneChip® Hybridisierung .....	48
2.6.6	Auswertungen der GeneChip® Hybridisierungen .....	50
2.7	Proteomanalyse mittels 2D Gelelektrophorese .....	50
2.7.1	Lösungen .....	51
2.7.2	Anzucht der Zellen .....	53
2.7.3	Ernten der Zellen.....	53
2.7.4	Proteinbestimmung mittels BCA-Test .....	54

2.7.5	Zellaufschluss .....	54
2.7.6	Proteinfällung .....	55
2.7.7	Proteinbestimmung mit dem PlusOne 2D Quant Kit .....	55
2.7.8	Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung .....	55
2.7.9	Isoelektrische Fokussierung .....	56
2.7.10	Vorbereitung der pH-Gradientenstreifen für die SDS-PAGE .....	56
2.7.11	Herstellung der Gele für die SDS-PAGE .....	56
2.7.12	SDS-PAGE .....	57
2.7.13	Fluoreszenzfärbung mit RuBPS .....	57
2.7.14	Auswertung der 2D Gele .....	58
2.7.15	Massenspektrometrie .....	58
2.7.16	Vorbereitung der Proben für die MALDI-TOF-Analyse .....	59
2.8	Metabolomanalyse mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie .....	60
2.8.1	Kultivierung der Zellen .....	60
2.8.2	Zellernte .....	61
2.8.3	Zellaufschluss und Vorbereitung für die Derivatisierung .....	61
2.8.4	Derivatisierung und Vermessung der Proben .....	61
3	Ergebnisse und Diskussion .....	63
3.1	Wachstumsverhalten in ASM .....	63
3.1.1	Wachstum im Flüssigmedium .....	63
3.1.2	Wachstum im Koloniebiofilm .....	66
3.2	Energiegewinnung in ASM .....	67
3.3	Wachstum von CF-Isolaten .....	70
3.4	Methioninauxotrophie in CF-Isolaten .....	72
3.4.1	Identifizierung methioninauxotropher CF-Isolate .....	73
3.4.2	Identifizierung von <i>metF</i> als verantwortliches Gen für die Methioninauxotrophie .....	74
3.4.3	<i>metF</i> und <i>quorum sensing</i> .....	77
3.5	Antibiotikaresistenz von <i>P. aeruginosa</i> in ASM .....	79
3.5.1	Bestimmung minimaler inhibitorischer Konzentrationen .....	79
3.5.2	Antibiotikaresistenz in Abhängigkeit von der Nitrat-Konzentrationen .....	80
3.5.3	Antibiotikaresistenz während der Stationärphase .....	82
3.5.4	Analysen zur Antibiotikaresistenz .....	84
3.5.4.1	Transkriptomanalyse .....	84

3.5.4.2	Proteomanalyse .....	91
3.5.4.3	Metabolomanalyse .....	93
3.5.4.4	Zusammenfassung .....	96
3.5.5	Faktoren für die Antibiotikaresistenz .....	99
3.5.5.1	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase GlpD .....	99
3.5.5.2	MexA der MexAB-OprM Effluxpumpe .....	99
3.5.5.3	S-Adenosylhomocystein-Hydrolase SahH .....	100
3.5.5.4	OprD-Protein der äußeren Membran.....	101
3.5.5.5	Spermidin .....	102
3.5.6	Mutanten-Studien .....	103
3.5.6.1	Wachstum von Mutanten auf ASM-Agar .....	103
3.5.6.2	Antibiotikaresistenz von Mutanten während der Stationärphase .....	104
3.5.6.3	Antibiotikaresistenz von Mutanten in Abhängigkeit von der Nitrat- Konzentration .....	107
4	Zusammenfassung und Ausblick .....	109
4.1	Zusammenfassung .....	109
4.2	Ausblick .....	110
5	Literaturverzeichnis.....	111
6	Anhang .....	128
7	Danksagung .....	153



# Abkürzungen

2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-bindende Kassette (ATP binding cassette)
ADP	Adenosondiphosphat
AHL	Acetylhomoserinlaktat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASM	artifizielles Sputum Medium
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaare (base pairs)
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	copy DNA
CF	Mukoviszidose, zystische Fibrose (cystic fibrosis)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-amino]-1-Propansulfat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid (A-, C-, G-, T-)-5'-triphosphat
dSAM	decarboxyliertes S-Adenosylmethionin
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure (diethylenetriaminepentaacetic acid)
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
F	Farad (elektrische Kapazität)
Flp	Flippase
FRT	Zielsequenz der Flp-Rekombinase (Flp recombinase target)
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IEF	isoelektrische Fokussierung

## ABKÜRZUNGEN

k	kilo
kb	Kilobasenpaare (1 kb = 1000 bp)
konz.	konzentriert
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
m	milli
M	Mol
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight
Me-THF	N <sup>5</sup> -Methyltetrahydrofolat
Me-THP	N <sup>5</sup> -Methyltetrahydropteroyltriglutamat
MIC	minimale inhibitorische Konzentration (minimum inhibitory concentration)
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Mr	relative Molekülmasse
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
n	nano
NO <sub>x</sub>	Nitrat und Nitrit
OD <sub>xyz</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda = xyz$ nm
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pI	isoelektrischer Punkt
p	piko
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
reinst. H <sub>2</sub> O	Wasser mit einer Leitfähigkeit von $\leq 0,05 \mu\text{S}$
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
rRNA	ribosomale RNA

RT	Raumtemperatur
RuBPS	Ruthenium-II-bathophenanthrolindisulfonat
S	Siemens (elektrischer Leitwert)
SAM	S-Adenosylmethionin
SAP	alkalische Phosphatase aus Garnele (shrimp alkaline phosphatase)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphism)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
techn.	technisch (Reinheitsgrad von Chemikalien)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
THF	Tetrahydrofolat
THP	Tetrahydropteroyltriglutamat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Units
UMP	Uridinmonophosphat
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt (elektrische Spannung)
W	Watt (elektrische Leistung)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galaktopyranosid
(v/v)	Volumen pro Volumen (volume per volume)
(w/v)	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
$\mu$	mikro
$\Omega$	Ohm (elektrischer Widerstand)
$\varnothing$	Durchmesser



# 1 Einleitung

## 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein gram-negatives, bewegliches, stäbchenförmiges Bakterium, das zur Gruppe der  $\gamma$ -Proteobakterien gehört. Dieser ubiquitär vorkommende Mikroorganismus kann sich in einer großen Bandbreite ökologischer Nischen vermehren, z. B. in Böden, Mooren, an Meeresküsten aber auch auf Pflanzen, Tieren und Menschen (Stover *et al.*, 2000). Das Bakterium zeichnet sich durch eine hohe intrinsische Antibiotikaresistenz aus, was gerade in seiner Eigenschaft als opportunistisches Pathogen zu Problemen führt (Lambert, 2002).

*P. aeruginosa* ist ein Modellorganismus für die Biofilmbildung (O'Toole *et al.*, 2000). Biofilme werden als strukturierte Gemeinschaften von bakteriellen Zellen definiert, die in einer selbst produzierten Matrix aus polymeren Substanzen eingeschlossen sind und an abiotischen oder lebenden Oberflächen haften (Costerton *et al.*, 1999). Ebenfalls wird das Bakterium als Modellorganismus für die Kommunikation zwischen Zellen durch das so genannte *quorum sensing* herangezogen (Juhas *et al.*, 2005; Withers *et al.*, 2001).

Das Genom des Stammes PAO1 hat eine Größe von ca.  $6,3 \times 10^6$  Basenpaaren (bp) und zum Zeitpunkt dieser Arbeit sind 5671 offene Leseraster bekannt (Winsor *et al.*, 2009). Allerdings kann es zwischen unterschiedlichen Stämmen zu z. T. erheblichen Unterschieden im Genom und in der Genomgröße kommen, die zwischen  $5$  und  $7 \times 10^6$  bp variieren kann (Mathee *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 1996). Es ist bemerkenswert, dass rund 10 % der offenen Leseraster für bekannte oder mögliche transkriptionelle Regulatoren bzw. Zweikomponentensysteme kodieren, die es dem Bakterium ermöglichen sich an die unterschiedlichsten Umweltbedingungen anzupassen (Juhas *et al.*, 2005; Stover *et al.*, 2000).

### 1.1.1 Aerober Energiemetabolismus

*P. aeruginosa* besitzt einen sehr effizienten Metabolismus, was sich an der relativ kurzen Generationszeit von nur 20 min bei 37 °C zeigt. In Gegenwart von Sauerstoff führt das Bakterium eine aerobe Respiration zur Oxidation von verschiedenen Kohlenstoffquellen durch.

Über substratspezifische, primäre Dehydrogenasen werden Elektronen aus Redoxreaktionen über die Elektronentransportkette zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasser genutzt. Dabei werden Protonen zum Aufbau der protonenmotorischen Kraft über die Cytoplasma-

membran transportiert, wobei ein Protonengradient entsteht. Dieser wird von dem Transmembranprotein ATPase genutzt um die beim Rückstrom der Protonen in das Cytoplasma freigesetzte Energie zur Synthese von ATP aus ADP und Phosphat zu verwenden und damit die zentrale energiereiche Verbindung für eine Vielzahl zellulärer Prozesse bereitzustellen (Williams *et al.*, 2007).

Der Glukose-Abbau erfolgt in *P. aeruginosa* über den Entner-Doudoroff-Weg, der aufgrund der Bildung des Intermediats 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat auch als KDPG-Weg bezeichnet wird (Lessie & Phibbs, 1984). Das Bakterium ist in der Lage sehr viele Kohlenstoffquellen zu verwerten, wie verschiedene Mono-, Di- und Tri-Carbonsäuren, Alkohole, Glykole, Fettsäuren, Zucker, aromatische Verbindungen, Amine und Aminosäuren (Palleroni, 1992). *P. aeruginosa* bevorzugt gegenüber Glukose organische Säuren, besonders Produkte des Citrat-Zyklus, als Kohlenstoff und Energiequelle (Palleroni, 1992).

### 1.1.2 Anaerober Energiemetabolismus

Unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Nitrat oder Nitrit kann eine anaerobe Respiration durchgeführt werden, wobei die Stickstoffverbindungen vollständig zu molekularem Stickstoff reduziert werden (Davies *et al.*, 1989). Fehlen diese Elektronenendakzeptoren, kann *P. aeruginosa* durch Fermentation von Arginin oder Pyruvat wachsen oder überleben (Eschbach *et al.*, 2004; Vander Wauven *et al.*, 1984).

#### 1.1.2.1 Denitrifikation

Die effizienteste Form der anaeroben Energiegewinnung ist die Denitrifikation. Anstelle von Sauerstoff wird Nitrat oder Nitrit als terminaler Elektronenendakzeptor verwendet. Der Begriff Denitrifikation fasst unterschiedliche Prozesse zusammen, bei der die schrittweise Reduktion von Nitrat über Nitrit, Stickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid zu molekularem Stickstoff erfolgt. Auf diese Weise werden Protonen zum Aufbau der protonenmotorischen Kraft über die Cytoplasmamembran transportiert (Zumft, 1997).



Nitrat wird über die beiden Transmembranproteine NarK<sub>1</sub>K<sub>2</sub> in die Zelle transportiert, von denen nur NarK<sub>2</sub> essentiell für den Transport von Nitrat und Nitrit zu sein scheint (Sharma *et al.*, 2006).

Der erste Schritt der Denitrifikation, die Reduktion von Nitrat zu Nitrit, kann durch die dissimilatorische Nitrat-Reduktase NarGHI, die in der inneren Membran und im Cytoplasma lokalisiert ist oder durch die periplasmatische NapABC katalysiert werden (siehe Abb. 1).

NarGHI besteht aus drei Untereinheiten. Das Membranprotein NarI oxidiert Ubiquinol, transferiert die Protonen über die Membranen ins Periplasma und die Elektronen durch ein Häm *b* zur cytoplasmatischen Untereinheit NarH. Diese transportiert wiederum die Elektronen über die vier  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster zum Molybdän-Kofaktor von NarG, an dem Nitrat zu Nitrit reduziert und dabei Wasser gebildet wird (Philippot & Hojberg, 1999; Zumft, 1997). Außerdem ist die NarGHI Nitrat-Reduktase ein entscheidender Faktor für die Virulenz in einem *Caenorhabditis elegans*-Modell und ist anscheinend essentiell für das Wachstum durch Denitrifikation in der Mukoviszidose-Lunge (Palmer *et al.*, 2007b; Van Alst *et al.*, 2007). NarGHI sowie NarK<sub>1</sub>K<sub>2</sub> werden durch das *narK<sub>1</sub>K<sub>2</sub>GHIJ*-Operon kodiert (Schreiber *et al.*, 2007). NarJ ist kein Teil der Nitrat-Reduktase, ist aber am Aufbau des Enzyms beteiligt (Zumft, 1997). Die Expression des *narK<sub>1</sub>K<sub>2</sub>GHIJ*-Operons ist abhängig von dem sauerstoffdetektierenden Regulator Anr, dem stickstoffmonoxiddetektierenden Regulator Dnr und dem nitratmessenden Zweikomponentensystem NarX-NarL (Schreiber *et al.*, 2007).

Die zweite dissimilatorische Nitrat-Reduktase NapABC besteht aus drei Untereinheiten (Philippot & Hojberg, 1999; Zumft, 1997). NapC, ein membrangebundenes Cytochrom *c*, transportiert die Elektronen vom Quinonpool zu NapB, einem im Periplasma lokalisierten Cytochrom *c*. Von da aus werden die Elektronen zum NapA transferiert, welches aus einem  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster und einem Molybdän-Kofaktor besteht. Im Gegensatz zur NarGHI ist NapABC nicht an der Translokation von Protonen und daher nicht an der Energiegewinnung mittels protonenmotorischer Kraft beteiligt. Allerdings kann dieses Enzym sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen Nitrat reduzieren, was möglicherweise zur Aufrechterhaltung des Redoxpotentials der Zelle dient und wichtig für den Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen oder die aerobe Denitrifikation ist (Davies *et al.*, 1989; Philippot & Hojberg, 1999). Außerdem konnte ein Selektionsvorteil der periplasmatischen Nitrat-Reduktase von *Escherichia coli* während nitratlimitierten Bedingungen gezeigt werden (Potter *et al.*, 1999).

Die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid wird durch die Nitrit-Reduktase NirS katalysiert, eine Cytochrom *cd<sub>1</sub>* Reduktase, die im Periplasma lokalisiert ist (Silvestrini *et al.*,

1994). Als Elektronendonoren dienen NirM, ein Cytochrom *c*<sub>551</sub> und NirC, ein periplasmatisches Cytochrom *c* (Arai *et al.*, 1990; Hasegawa *et al.*, 2001). Außerdem könnte das blaue Kupferprotein Azurin als Elektronendonator dienen (Arvidsson *et al.*, 1989). Das *nirS* Gen ist im *nirSMCFDLGHJEN* Gencluster organisiert, welches durch den Stickstoffmonoxid-Sensor Dnr induziert wird (Arai *et al.*, 1995b). Die Gene *nirFDLGHJE* werden für die Biosynthese von Häm *d*<sub>1</sub> benötigt, während die Funktion des periplasmatischen, von *nirN* kodierten, Cytochrom *c* bislang unbekannt ist (Hasegawa *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 1995).

Die Reduktion des hoch toxischen Stickstoffmonoxids zu zwei Molekülen Distickstoffmonoxid wird im Periplasma durch die membrangebundene Reduktase NorCB katalysiert. Diese ist ein Cytochrom *bc* und wird von *norCB* kodiert (Arai *et al.*, 1995a). Im Weiteren wird Distickstoffmonoxid durch das periplasmatische NosZ-Homodimer zu molekularem Stickstoff reduziert. Das kodierende Gen *nosZ* ist im *nosRZDFYL*-Gencluster organisiert, welches möglicherweise als Operon transkribiert wird (Arai *et al.*, 2003).

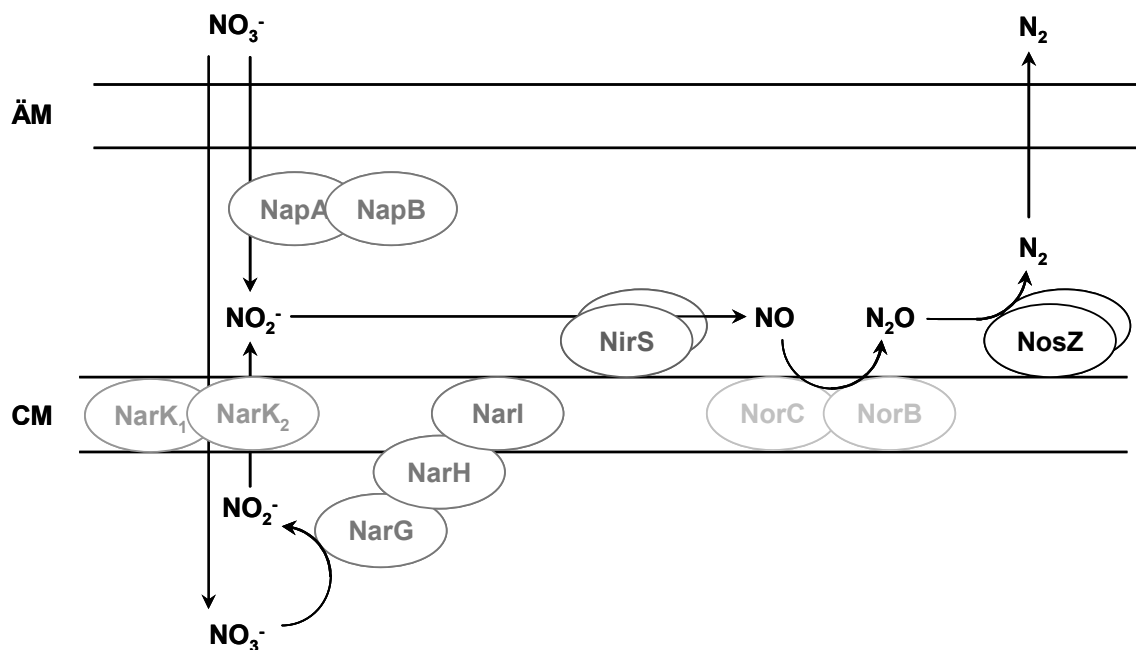


Abb. 1: Schematische Darstellung der Denitrifikation in *P. aeruginosa*. Nitrat durch NapAB im Periplasma zu Nitrit reduziert oder durch NarK<sub>1</sub>K<sub>2</sub> in die Zelle transportiert, wo die Reduktion zu Nitrit durch NarGHI erfolgt, das anschließend zurück ins Periplasma transportiert wird. Dort wird Nitrit von NirS zu Stickstoffmonoxid, durch NorCB zu Distickstoffmonoxid und schließlich von NosZ zu molekularem Stickstoff reduziert. CM: Cytoplasmamembran, ÄM: Äußere Membran.



### 1.1.2.2 Argininfermentation

Fehlen terminale Elektronenendakzeptoren kann *P. aeruginosa* durch die Fermentation der Aminosäure Arginin wachsen. Ein Molekül Arginin wird dabei unter Gewinnung eines Moleküls ATP zu Ornithin, CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> umgewandelt, was ein langsames Wachstum ermöglicht (Vander Wauven *et al.*, 1984).

Die Gene der beteiligten Enzyme sind im *arcDABC*-Operon organisiert (Luthi *et al.*, 1990). Zuerst erfolgt die Desaminierung von Arginin zu Citrullin durch die Arginin-Deaminase (ArcA). Im weiteren Verlauf wird Citrullin durch ArcB zu Ornithin und Carbomoylphosphat umgewandelt. Ornithin kann nicht weiter metabolisiert werden und wird über den, in der Cytoplasmamembran lokalisierten, Arginin-Ornithin-Antiporter (ArcD) aus der Zelle transportiert. Die Carbamat-Kinase ArcC setzt Carbomoylphosphat zu CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> um, wobei durch Substratkettenphosphorylierung ein Molekül ATP entsteht (siehe Abb. 2) (Williams *et al.*, 2007).

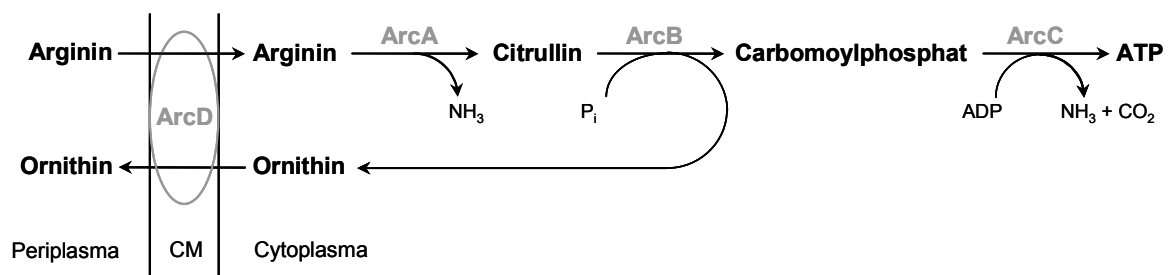


Abb. 2: Schematische Darstellung der Argininfermentation in *P. aeruginosa* in Anlehnung an Gamper *et al.* (1991). Arginin wird zu Ornithin sowie NH<sub>3</sub> und CO<sub>2</sub> unter Gewinnung von ATP umgewandelt. CM: Cytoplasmamembran.

### 1.1.2.3 Pyruvatfermentation

*P. aeruginosa* hat die Möglichkeit unter anaeroben Bedingungen durch eine Fermentation von Pyruvat längere Zeit ohne alternative Elektronenakzeptoren oder Arginin zu überleben, wobei allerdings kein Wachstum stattfindet (Eschbach *et al.*, 2004). Dabei wird Pyruvat zu Succinat, Acetat und Laktat umgewandelt (Abb. 3). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression des Gens *ldhA*, welches für die Laktat-Dehydrogenase kodiert, unabhängig von Sauerstoff ist. Dagegen steht das *ackA-pta*-Operon, dessen Proteine an der Metabolisierung von Pyruvat zu Acetat zusammen mit einer bis jetzt unbekannten Pyruvat-Dehydrogenase beteiligt sind, unter der Kontrolle des anaeroben Regulators Anr und des Integration Host Factors (IHF) (Eschbach *et al.*, 2004).

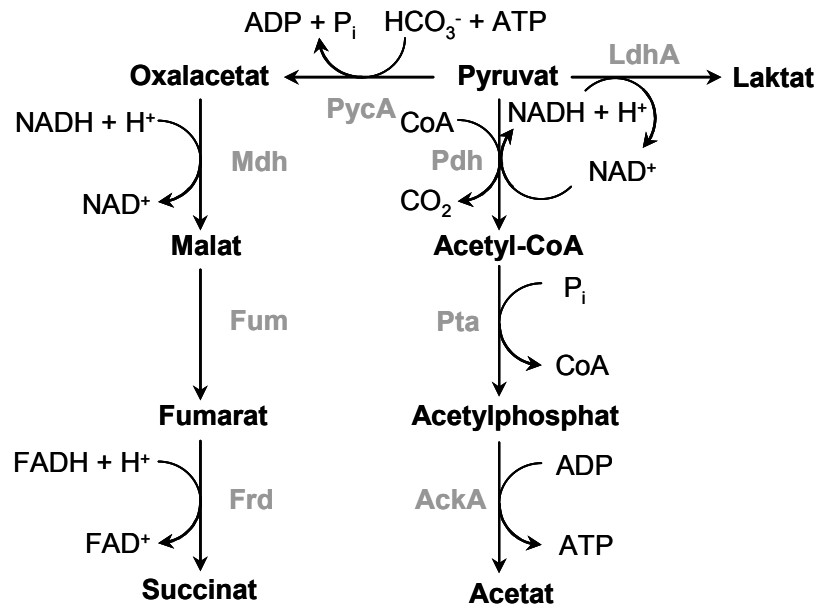


Abb. 3: Schematische Darstellung der postulierten Pyruvatfermentation in *P. aeruginosa* in Anlehnung an Eschbach *et al.* (2004). Pyruvat wird entweder durch die Laktat-Dehydrogenase (LdhA) in Laktat oder durch die Pyruvat-Dehydrogenase (Pdh), die Phosphotransacetylase (Pta) und Acetat-Kinase (AckA) zu Acetat umgewandelt. Der Abbau zu Succinat erfolgt über die Pyruvat-Decarboxylase (PycA), die Malat-Dehydrogenase (Mdh), die Fumarase (Fum) und die Fumarat-Reductase (Frd).

#### 1.1.2.4 Regulation des anaeroben Metabolismus

Für das Wachstum unter anaeroben Bedingungen ist die Synthese einer Vielzahl von Proteinen für Denitrifikations- und Fermentationsprozesse notwendig. In *P. aeruginosa* spielt der sauerstoffdetektierende Regulator Anr (anaerober Regulator der Arginin-Deaminase und Nitrit-Reduktase) eine essentielle Rolle (Sawers, 1991). Dessen, mit 51 % Aminosäuresequenzidentität deutliche Ähnlichkeit zum Fnr-Regulator (Fumarat- und Nitrat-Reduktase Regulator) von *E. coli*, lässt eine korrespondierende Funktion vermuten. Fnr ist ein transkriptioneller Regulator, der Sauerstoff durch ein  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster detektiert, welcher durch vier Cysteine koordiniert wird. Unter aeroben Bedingungen liegt der sauerstoffsensitive Cluster als monomerer  $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster vor und ist inaktiv. Bei Sauerstoffkonzentrationen unter  $10 \mu\text{M}$  kommt es zur Ausbildung des  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Clusters und danach zur Dimerisierung. Dieses Dimer wirkt als Transkriptionsfaktor und kann an spezifische, konservierte DNA-Erkennungssequenzen binden, die so genannte Fnr-Box (Unden *et al.*, 2002). Für Anr von *P. aeruginosa* konnte ebenfalls ein  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster nachgewiesen werden und das Protein bindet in gleicher Weise an eine DNA-Sequenz, die als Anr-Box bezeichnet wird (Yoon *et al.*, 2007). Dadurch wird direkt die Expression vom *arcDABC*-Operon aktiviert, deren Genprodukte für die Argininfermentation zuständig sind sowie die Expression von Denitrifikationsgenen beeinflusst (Gamper *et al.*, 1991; Lu *et al.*,

1999; Ye *et al.*, 1995). Letztere werden direkt vom Stickstoffmonooxid-Sensor Dnr und dem Zweikomponentensystem NarX-NarL reguliert.

Dabei ist Dnr in die Regulation der, für den Abbau von Nitrat zu molekularem Stickstoff erforderlichen Reduktasen *nar*, *nir*, *nor* und *nos* involviert (Schreiber *et al.*, 2007). Das Regulatorgen wird seinerseits durch Anr und das Dnr-Protein wird durch Stickstoffmonooxid aktiviert, wobei die Detektion von gasförmigem Stickstoffmonoxid möglicherweise durch dessen Bindung an eisenhaltiges Häm erfolgt (Arai *et al.*, 1995b; Arai *et al.*, 2003; Giardina *et al.*, 2008).

Das Zweikomponentensystem NarX-NarL ist in die Genregulation der cytoplasmatischen Nitrat-Reduktase *narK<sub>1</sub>K<sub>2</sub>GHJ* und des Regulators *nirQ* involviert, wobei NarX als Sensorkinase und NarL als Regulatorprotein fungiert (Schreiber *et al.*, 2007).

Des Weiteren konnte eine reprimierende Wirkung von Acetylhomoserinlaktone (AHLs) auf die Expression von Denitrifikationsgenen gezeigt sowie ein Einfluss des Quinolonsignals PQS auf die Aktivität von Enzymen beobachtet werden, die an der Denitrifikation beteiligt sind (Toyofuku *et al.*, 2007; Toyofuku *et al.*, 2008).

### 1.1.3 *P. aeruginosa* als opportunistisches Pathogen

*P. aeruginosa* ist in der Lage eine Vielzahl von Infektionen auszulösen. Dabei beschränkt sich der Organismus nicht auf einen Wirt, sondern ist als opportunistisches Pathogen von Menschen, Tieren, Insekten, Nematoden und Pflanzen bekannt (D'Argenio *et al.*, 2001; Rahme *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1999; Van Alst *et al.*, 2007). Beim Menschen ist es unter anderen verantwortlich für Harnwegs- sowie Augeninfektionen, Infektionen von Brandwunden und des Respirationstrakts (Lyczak *et al.*, 2000).

Meistens werden Patienten infiziert, deren Immunsystem nach einer Chemotherapie, nach Transplantationen oder HIV-Infektionen supprimiert ist (Van Delden & Iglewski, 1998). Auch in Krankenhäusern ist das Bakterium häufig zu finden und verantwortlich für ca. 10 bis 20 % aller nosokomialen Infektionen, wobei die große Anzahl multiresistenter Keime ein erhebliches Problem darstellt (Hassett *et al.*, 2009; Traub *et al.*, 1998; Van Eldere, 2003; Wagner & Iglewski, 2008). *P. aeruginosa* spielt eine wichtige Rolle bei Patienten mit der Erbkrankheit Mukoviszidose, wobei das Bakterium chronische Lungeninfektionen verursacht, die zu einem kompletten Verlust der Lungenfunktion und damit zum Tod führen (Campodonico *et al.*, 2008).

## 1.2 Mukoviszidose

Die Mukoviszidose, auch zystische Fibrose (engl. cystic fibrosis; CF) genannt, ist die häufigste und tödlich verlaufende, genetisch bedingte, autosomal rezessive Erkrankung der weißen Bevölkerung. Diese wird verursacht durch einen Defekt in dem Gen, welches für den Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), einen Chlorid-ABC-Transporter, kodiert. Das Gen ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert und wurde erstmalig 1989 als Ursache der CF identifiziert (Riordan *et al.*, 1989). Inzwischen sind über 1500 Mutationen des Gens bekannt und am häufigsten liegt eine Deletion des Phenylalanins an Position 508 vor. Je nach Mutationsort verläuft die Erkrankung mehr oder weniger schwer und wird in unterschiedliche Klassen eingeteilt (O'Sullivan & Freedman, 2009).

Größtenteils ist die weiße Bevölkerungsgruppe betroffen, bei der ca. jedes 3000ste Neugeborene an CF leidet. Andere ethnische Gruppen sind ebenfalls betroffen, allerdings mit einer geringeren Häufigkeit. So leidet eins von 15 000 - 20 000 afrikanischen Neugeborenen bzw. eins von 100 000 neugeborenen Asiaten an CF (Huang *et al.*, 2008; O'Sullivan & Freedman, 2009). Während die Lebenserwartung eines CF-Patienten im Jahr 1969 nur bei 8,4 Jahren lag, gehen aktuelle Studien davon aus, dass ein Patient heutzutage eine Lebenserwartung von ca. 50 Jahren hat (O'Sullivan & Freedman, 2009; Ratjen & Döring, 2003).

Das CFTR-Protein wird in vielen Epithel- und Blutzellen exprimiert. Obwohl das Protein hauptsächlich als Chlorid-Kanal fungiert, hat es viele zusätzliche regulatorische Funktionen, wie die Regulation von ATP- und Chlorid-Kanälen sowie den Transport intrazellulärer Vesikel, wie auch die Säurebildung in Organellen, die Hemmung des Natrium-Transports durch Natrium-Kanäle im Epithel sowie die Hemmung von calciumabhängigen Chlorid-Kanälen (O'Sullivan & Freedman, 2009).

Der Defekt führt zu einer veränderten Zusammensetzung von Sekreten, die von exokrinen Drüsen produziert werden. Dabei leidet ein großer Teil der Patienten unter Pankreasinsuffizienz, was in Folge der Mangelernährung schließlich zur Autolyse des Organs führt und Diabetes verursacht. Aber auch der Fortpflanzungsapparat, die Leber, der Darm, die Schweißdrüsen und Stirnhöhlen sind betroffen (Ratjen & Döring, 2003).

Weitaus problematischer sind die Auswirkungen auf den respiratorischen Komplex. In einer gesunden Lunge bildet sich über den Epithelzellen eine Schleimschicht aus. Dieser so genannte Mucus fängt Fremdkörper sowie Bakterien ab und transportiert diese durch dem Lungenepithel aufgelagerte Cilien aus der Lunge heraus (siehe Abb. 4 links). Sollte dieser Schutzmechanismus einmal versagen, löst der direkte Kontakt der Antigene mit den Epi-

thelzellen eine Immunantwort aus. In einer CF-Lunge dagegen wird der Mucus durch die veränderte Zusammensetzung so viskos, dass sich eine extrem dicke Mucusschicht bildet, die die Cilienbewegung unterbindet und der Mucus nicht mehr aus der Lunge abtransportiert werden kann. Dies prädisponiert die Patienten für bakterielle Lungeninfektionen (siehe Abb. 4 Mitte).

Wie die CFTR-Dysfunktion zum CF-Phänotyp führt, ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt und es gibt unterschiedliche Hypothesen wie der gestörte Wasser-, Chlorid- und Natriumionentransport dazu beiträgt (O'Sullivan & Freedman, 2009). Wahrscheinlich kommt es zu einem eingeschränkten Chloridionenexport aus den Epithelzellen, was die erhöhte Aufnahme von Natriumionen sowie Wasser aus dem Mucus zur Folge hat und so zu dessen erhöhter Viskosität führt (Lyczak *et al.*, 2002). Neuste Hypothesen lassen auch einen gestörten Hydrogencarbonat-Transport in CF-Patienten vermuten. Aufgrund dessen aggregieren die zum Aufbau des Mucus notwendigen makromolekularen Glykoproteine, so genannte Muzine, was eine erhöhte Viskosität des Mucus zur Folge hat (Quinton, 2008).

Durch *in situ* Sauerstoffmessungen mit einer Sauerstoffelektrode konnte ein steiler Sauerstoffgradient über den, das Lungenepithel bedeckenden, CF-Mucus detektiert werden. Im Gegensatz zu gesunden Zellen verbrauchen CF-Zellen mehr Sauerstoff durch die gestörte Regulation von ATP-Kanälen (siehe oben). Zusätzlich wird der Sauerstoff durch Bakterien und Neutrophile verbraucht, was in dieser Kombination zu einem anaeroben Milieu führt (Abb. 4 Mitte) (Worlitzsch *et al.*, 2002).

Die CFTR-bedingte Anreicherung von Mucus prädisponiert CF-Patienten für Infektionen und führt in unterschiedlichen Lebensstadien zur Kolonisation mit charakteristischen Keimen. Im Säuglingsalter und der frühen Kindheit werden meistens *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* nachgewiesen, die möglicherweise das Epithel schädigen und so eine bessere Anlagerung des später dominierenden Keims *P. aeruginosa* ermöglichen (Lyczak *et al.*, 2002). Von der Geburt bis zum Alter von 5 Jahren sind ca. 10 - 30 % der Kinder mit *P. aeruginosa* infiziert, während CF-Patienten über 18 Jahren in bis zu 80 % aller Fälle diesen Keim tragen (Campodonico *et al.*, 2008). Das Auftreten von *P. aeruginosa* in der Lunge und die damit hervorgerufene Immunantwort sind mit einer Schädigung des Lungengewebes verbunden. Es kommt zu einem Rückgang bis zum totalen Verlust der Lungenfunktion, was der maßgebliche Grund für die Morbidität und letztendlich den Tod der Patienten ist (Ratjen & Döring, 2003)

Außerdem sind Infektionen mit *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* und Mykobakterien wie *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium abscessus* beschrieben worden sowie Pilzinfektionen mit *Aspergillus fumigatus* (O'Sullivan & Freedman, 2009).

Auch finden sich Anaerobier in der CF-Lunge. Dazu gehören am häufigsten Bakterien der Gattung *Prevotella*, *Veillonella*, *Propionibacterium* und *Actinomyces*, die eindeutig auf ein anaerobes Milieu in der CF-Lunge hinweisen (Tunney *et al.*, 2008).

Die Behandlung von chronischen Lungeninfektionen bei CF-Patienten wird mit unterschiedlichen Mitteln je nach vorkommenden Bakterien durchgeführt. Meist werden rekombinante menschliche DNase I und hypotonische Salzlösungen zur Verflüssigung des Mucus eingesetzt. Des Weiteren werden unterschiedliche Antibiotika eingesetzt, die oral oder in inhalierter Form verabreicht werden, wie z. B. Tobramycin. Auch entzündungshemmende Medikamente wie Ibuprofen kommen zum Einsatz. Durch spezielle Physiotherapie wird den Patienten ein Abhusten des Mucus ermöglicht. Außerdem ist eine spezielle Ernährung lebensnotwendig. Neben der Lungentransplantation gibt es die Option der Gentherapie, die bislang aber noch nicht ausgereift ist (O'Sullivan & Freedman, 2009).

### 1.3 Die Rolle von *P. aeruginosa* in der Mukoviszidose

*P. aeruginosa* gelangt als ubiquitärer Keim über die Atemwege in die Lunge und kann dort aktiv in den Mucus eindringen (Abb. 4 Mitte). Im Gegensatz zu *in vitro* Flüssigkulturen, in denen das Bakterium planktonisch in einzelnen Zellen wächst, kommt es unter natürlichen Bedingungen zur Bildung von Biofilmen, die einerseits an festen Oberflächen haften können, z. B. bei der ersten Kolonisation des CF-Lungenepithels durch *P. aeruginosa* (Lau *et al.*, 2005). Andererseits können sich so genannte Mikrokolonien bilden, wobei die Bakterien aneinander und an Mucusbestandteilen haften, aber nicht an einer Oberfläche (Lam *et al.*, 1980; Worlitzsch *et al.*, 2002). Diese Biofilmbildung geht mit Veränderungen der Physiologie der Bakterien einher, wie z. B. die Bildung von Proteinen zum Schutz vor oxidativem Stress und die Exopolysaccharidproduktion (Sauer *et al.*, 2002). Letztere schützt die Bakterien vor dem menschlichen Immunsystem (Drenkard, 2003).

Im Mucus wachsen die Bakterien in charakteristischen biofilmähnlichen Mikrokolonien in einem mikroaeroben bis anaeroben Milieu, wobei die Bakterien von einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) wie Lipiden, Proteinen, DNA und Polysacchariden, z. B. Alginat, umschlossen sind (Lam *et al.*, 1980; Moreau-Marquis *et al.*, 2008;

Singh *et al.*, 2000; Worlitzsch *et al.*, 2002). Es wurde beschrieben, dass *P. aeruginosa* es „vorzieht“ unter anaeroben Bedingungen im Biofilm zu wachsen, wobei es zur Bildung von robusteren Biofilmen im Vergleich zu aeroben Bedingungen kommt (Yoon *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu einer gesunden Lunge liegen im CF-Sputum erhöhte Konzentrationen von Nitrat und Nitrit vor, deren Herkunft bis jetzt noch nicht geklärt ist. Unterschiedliche Theorien führen dies auf die Aktivität von Superoxiden zurück, die durch Neutrophile freigesetzt werden (Jones *et al.*, 2000) oder postulieren eine Anreicherung durch spontane Oxidation von reaktiven Stickstoffspezies (Palmer *et al.*, 2007b). Die Konzentrationen von Nitrat und Nitrit variieren zwischen 73  $\mu\text{M}$  und 792  $\mu\text{M}$  und sind ausreichend um ein Wachstum zu ermöglichen (Grasemann *et al.*, 1998; Hassett, 1996; Linnane *et al.*, 1998; Palmer *et al.*, 2007b). Außerdem findet man im CF-Sputum Muzine, Lipide, Proteine, Aminosäuren, Ionen und DNA, die durch Neutrophile ausgeschüttet wird. Diese Konzentrationen liegen oberhalb der bei gesunden Patienten gefundenen Werte (Barth & Pitt, 1996; Kilbourn, 1978; Sahu & Lynn, 1978; Smith *et al.*, 1988). Es wird vermutet, dass *P. aeruginosa* hauptsächlich durch den Abbau von Aminosäuren überleben und so Zellenzahlen von mehr als  $10^9$  Bakterien pro ml Sputum erreichen kann (Palmer *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2000; Son *et al.*, 2007; Sriramulu *et al.*, 2005).

Nach einer anfänglichen Kolonisierung kommt es zu einer phänotypischen Veränderung der *P. aeruginosa*-Stämme, die durch eine Überproduktion von Alginat charakterisiert ist, was zu einem mucoiden Phänotyp führt und mit chronischen Infektionen assoziiert ist (Schurr *et al.*, 1996). Alginat vermindert zusätzlich die Diffusion von Sauerstoff zu den Bakterien und sorgt ebenfalls für ein anaerobes Milieu (Hassett, 1996). Selbst intensive Antibiotikabehandlungen können die Keime in diesem Stadium der Infektion nicht mehr abtöten (Ratjen & Döring, 2003).

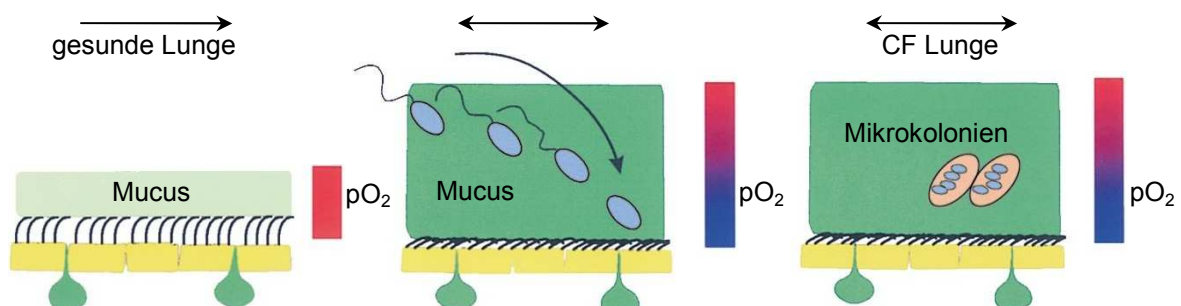


Abb. 4: Schematische Darstellung der Lunge von gesunden bzw. CF-Patienten mit *P. aeruginosa*-Infektion. Der aufgelagerte Mucus wird durch Cilienbewegung, die sich über den Epithelzellen (gelb) befinden, in einer gesunden Lunge abtransportiert, während in der CF-Lunge die Cilienbewegung zum Erliegen kommt und *P. aeruginosa* (blau) in den Mucus eindringen und Mikrokolonien bilden kann. Dabei liegt ein Sauerstoffgradient über den Mucus mit anaeroben Bereichen vor (angedeutet durch die Blaufärbung des seitlichen Balkens).

Die bakterielle Kolonisierung wird möglicherweise durch die einzigartige Zusammensetzung des Mucus begünstigt. Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass eine Korrelation zwischen individuellen Sputumbestandteilen und dem Auftreten oder der Stabilisierung von bestimmten *P. aeruginosa*-Phänotypen besteht (Govan, 1975; Sriramulu *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2002). Unabhängig davon wird eine direkte Verbindung zwischen dem mutierten CFTR-Protein und der Unfähigkeit des menschlichen Organismus die chronischen *P. aeruginosa*-Infektionen zu bekämpfen vermutet. Das CFTR-Protein soll in der gesunden Lunge als Rezeptor für *P. aeruginosa* dienen und deren Phagozytose veranlassen, was bei einem mutierten CFTR-Protein nur in abgeschwächter Form stattfindet (Coleman *et al.*, 2003; Pier *et al.*, 1997; Pier, 2000).

### 1.3.1 Virulenz von *P. aeruginosa* in der Mukoviszidose-Lunge

*P. aeruginosa* verfügt über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren die zur Schädigung des Lungengewebes beitragen und die Immunantwort des Wirtes stören. Dazu gehören die membrangebundenen Lipopolysaccharide sowie Flagellen und Pili, die notwendig für die Motilität sind. Auch das extrazelluläre Polysaccharid Alginat zählt dazu. Es umhüllt die Zellen mit einer schleimigen Schicht, was zum mucoiden Phänotyp führt und wird unter anaeroben Bedingungen produziert (Bragonzi *et al.*, 2005).

Die interzelluläre Kommunikation durch kleine, frei bewegliche Acetylhomoserinlaktone (AHL), mit denen die Zellen ihre eigene Populationsdichte messen, wird als *quorum sensing* bezeichnet und spielt ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese und Biofilmbildung von *P. aeruginosa*. Wird eine bestimmte Konzentration an AHLs überschritten, veränderte sich das Expressionsmuster von bis zu 10 % aller Gene (Heurlier *et al.*, 2006). Dabei sind Signalkomponenten wie das LasR/LasI bzw. RhIR/RhII-System und das Quinolonsignal PQS beteiligt, die nicht unabhängig von einander reagieren, sondern hierarchisch angeordnet sind und die Produktion diverser extrazellulärer Virulenzfaktoren wie Exoproteasen, Exotoxin A, Rhamnolipide, Phenazine und Cyanide kontrollieren (Geisenberger *et al.*, 2000; Lau *et al.*, 2005). Außerdem werden viele intrazelluläre Prozesse durch dieses System beeinflusst. Zellen produzieren in der CF-Lunge vergleichbare Konzentrationen an AHLs wie in einem *in vitro* Biofilm (Singh *et al.*, 2000).

Wirtsschädigende Effektorproteine werden durch Typ-III-Sekretionssysteme in Wirtszellen injiziert, wie z. B. das Cytotoxin ExoU, die GTPase aktivierenden Enzyme ExoS und ExoT sowie die Adenylatzyklase ExoY (Engel & Balachandran, 2009; Shaver & Hauser, 2004).



Zur Zellschädigung führen auch reaktive Sauerstoffspezies, die durch die sekundären *P. aeruginosa*-Metaboliten Hydroxyphenanzin, Phenanzincarboxat und weitere Phenazine, wie Pyocyanin, gebildet werden. Zur Virulenz trägt auch die Sekretion von Proteasen bei, wie die Elastasen LasA und LasB, die alkalische Phosphatase und Typ-IV-Protease, die zur Schädigung des Wirtsimmunsystems beitragen. Als Ergebnis der Degradation von Neutrophilen sind hohe Konzentrationen von Serin-Proteasen vorhanden, die zur Zerstörung des Lungengewebes führen (Ratjen & Döring, 2003). Außerdem verfügt *P. aeruginosa* über die Phospholipasen PlcH, PlcN, PlcB und PldA, die auch eine mögliche Rolle bei der Virulenz spielen (Lau *et al.*, 2005).

Das Exotoxin A, ein Inhibitor der Proteinsynthese, kann Epithelzellen durch Dysfunktion der Mitochondrien, Superoxid-Produktion und DNA-Degradation abtöten sowie zur Apoptose beitragen (Plotkowski *et al.*, 2002). Auch die Sekretion von Rhamnolipiden führt zur Schädigung der Epithelzellen. Bei der Lyse von *P. aeruginosa*-Zellen tritt die Nitrit-Reduktase NirS aus, die aufgrund ihres Effekts auf die Interleukin 8-Produktion ebenfalls zu den Virulenzfaktoren zählt (Mori *et al.*, 1999).

Zur anfänglichen Kolonisation der CF-Lunge und zur Auslösung einer akuten Infektion durch *P. aeruginosa* sind die Virulenzfaktoren entscheidend, wohingegen bei einer chronischen Infektion reduzierte Mengen extrazellulärer Virulenzfaktoren vorliegen (Lau *et al.*, 2005; Lyczak *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2006).

### 1.3.2 Anpassung von *P. aeruginosa* in der Mukoviszidose-Lunge

Im Allgemeinen wird ein CF-Patient mit einem einzelnen *P. aeruginosa*-Klon infiziert, der sich durch geno- und phänotypische Veränderungen an das Lungenmilieu anpasst (Lyczak *et al.*, 2002). Während des Wachstums in der Lunge kommt es zur Bildung von diversen Kolonieviationen, von denen angenommen wird, dass sie eine spezifische Adaptation an das Lungenmilieu darstellen. Es kommt zum Verlust der Motilität, sowie zur übermäßigen Typ-IV-Pilbildung und zur Modifikationen der Lipopolysaccharidschicht (LPS) (Ernst *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 1983; Mahenthiralingam *et al.*, 1994). So zeigen mucoide *P. aeruginosa*-Isolate von CF-Patienten keine Flagellen, was möglicherweise zu einer reduzierten Erkennung durch Neutrophile führt und dadurch die Überlebenschancen der Zellen erhöht (Cobb *et al.*, 2004).

Diverse auxotrophe *P. aeruginosa*-Stämme treten während des Wachstums in der CF-Lunge auf (Barth & Pitt, 1995; Barth & Pitt, 1996; Taylor *et al.*, 1993). Taylor *et al.* (1992) zeigten, dass ca. 18 % der klinischen Isolate aus der CF-Lunge einen oder mehrere Wachs-

tumsfaktoren benötigen. Die Methioninauxotrophie stellt dabei die häufigste Form dar (31 - 38 %), gefolgt von der Leucin- (8 %) und der Argininauxotrophie (8 %) (Barth & Pitt, 1995; Taylor *et al.*, 1992). Mit der Schwere der Infektion nimmt die Zahl auxotropher Stämme zu und kann bis zu 87 % betragen (Taylor *et al.*, 1993).

Weiterhin kommt es sehr häufig zu Mutationen im *quorum sensing*-System. Dabei sind die Gene der Regulatoren LasR und RhlR betroffen, was die Bildung von AHLs unterbindet. Dies führt zu einer geringeren Virulenz und ermöglicht den Zellen ein längeres Überleben bei hohen Zelldichten (Heurlier *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006).

Eine Form der Anpassung und ein kritischer Faktor für die Infektion ist die Bildung von Alginat. Häufig kommt es während der Pathogenese zu Mutationen im negativen Regulator der Alginatbiosynthese, dem *mucA*-Gen, was oft mit einem Funktionsverlust einhergeht (Martin *et al.*, 1993; Schurr *et al.*, 1996). Alginat scheint kritisch für die Virulenz zu sein, denn alginatdefiziente Stämme sind nicht in der Lage in einer CF-Maus eine chronische Infektion auszulösen (Coleman *et al.*, 2003).

Außerdem sind in der CF-Lunge so genannte Mutatorstämme zu finden, die sich durch eine besonders hohe Mutationsfrequenz auszeichnen. Diese wird durch eine Änderung im DNA-Reparaturmechanismus oder durch Mutationen in Genen, die für die Fehlervermeidung bei der Replikation verantwortlich sind, ausgelöst (Oliver *et al.*, 2000). Am häufigsten kommt es zur Mutation von *mutS*, welches an der Mismatch-Reparatur beteiligt ist, aber auch *mutL* und *uvrD* sind betroffen (Macia *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2002).

### 1.3.3 Multiple Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* ist schwer mit Antibiotika oder Desinfektionsmitteln zu kontrollieren, da das Bakterium über diverse Resistenzmechanismen verfügt. Es gibt drei grundsätzliche Mechanismen durch die *P. aeruginosa* resistent gegenüber Antibiotika werden kann: eine verringerte Aufnahme und gleichzeitiger Efflux, eine Inaktivierung des Antibiotikums sowie die Veränderung der Antibiotikazielstruktur (Lambert, 2002).

Antibiotika müssen zunächst die Zellenwand überwinden um an ihrem Zielort wirken zu können. Dies wird aufgrund der geringen Permeabilität der Zellwand erschwert und verleiht so dem Bakterium eine intrinsische Resistenz. Teilweise kommt es auch durch Veränderung von Membranproteinen zur Antibiotikaresistenz. So konnte gezeigt werden, dass z. B. der Verlust des Membranproteins OprD mit einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Imipenem einhergeht (Lynch *et al.*, 1987; Poole, 2005a). Sollten Antibiotikamolekü-

le diese erste Barriere überwunden haben, kommt es meist nicht zur Akkumulation der Substanzen in der Zelle, da *P. aeruginosa* zu einem sehr effizienten Export durch so genannte Effluxpumpen fähig ist. Diese Effluxpumpen bestehen aus drei Proteinkomponenten: einer energieabhängigen Pumpe, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, einem Protein in der äußeren Membran und einem Linkerprotein, welches die beiden Membrankomponenten verbindet. Dazu zählen in *P. aeruginosa* unter anderem die MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ und MexEF-OprN Effluxpumpen, die Antibiotika aber auch AHLs und toxische Substanzen wie Ethidiumbromid oder SDS exportieren (Poole, 2005a; Schweizer, 2003).

Zur Inaktivierung und Modifikation von Antibiotika hat *P. aeruginosa* die Möglichkeit ein großes Repertoire an genetisch determinierten Resistenzmechanismen zu exprimieren. Jeder *Pseudomonas*-Stamm verfügt über das *ampC*-Gen, welches für eine  $\beta$ -Laktamase kodiert und entsprechende Antibiotika hydrolysiert (Livermore, 1995). Außerdem gibt es viele plasmidkodierte Resistenzgene, deren Verbreitung durch horizontalen Gentransfer ermöglicht wird. Aber es sind nicht nur Resistenzgene für eine erhöhte Resistenz verantwortlich, sondern auch Mutationen in Regulatoren, wie z. B. *ampR*, welches *ampC* reguliert (Juan *et al.*, 2005; Poole, 2005b). Daher kommt es auch zum Einsatz von  $\beta$ -Laktamase-Hemmern, wobei auch gegen diese Medikamente bereits resistente Stämme gefunden worden sind. Außerdem gibt es modifizierende Enzyme, die mit cytoplasmatischen Kofaktoren wie Acetyl-CoA oder ATP Antibiotika modifizieren und damit wirkungslos machen, wie z. B. durch die Acetylierung von Aminoglykosiden. Weiterhin kann der Mikroorganismus zusätzliche Resistenzgene von anderen Organismen durch den Transfer von Plasmiden, Transposons oder Bakteriophagen erhalten (Poole, 2005b).

Ein weiterer Resistenzmechanismus ist die, durch Mutationen bedingte Veränderung von Strukturen, die als Ziel von Antibiotika genutzt werden. In *P. aeruginosa* sind häufig Mutationen im *gyrA* oder *parC*-Gen zu finden, was eine Veränderung der DNA-Gyrase zur Folge hat und so Quinolone wirkungslos macht (Akasaka *et al.*, 2001; Jalal *et al.*, 2000). Außerdem kommt es zu Veränderungen in der Struktur der 30S Untereinheit der Ribosomen, deren antimikrobieller Wirkort Aminoglykoside sind oder Veränderungen im penicillinbindenden Protein, was zu einer  $\beta$ -Laktam-Resistenz führt (Lambert, 2002).

Neben diesen Mechanismen geht auch von der Wachstumsform der Bakterien eine Resistenz aus. Wie bereits angedeutet, ist *P. aeruginosa* in der Lage so genannte Biofilme zu bilden, wobei die Zellen an abiotischen oder lebenden Oberflächen haften und dabei in einer selbst produzierten Matrix aus polymeren Substanzen eingebettet sind (Costerton *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass diese Struktur die Diffusion im Biofilm beeinflusst und zu einer sehr heterogenen Gemeinschaft führt. Während im Randbereich von Biofilmen meist ausreichend Nährstoffe und Sauerstoff vorhanden sind, kommt es im Inneren zu Mangelbedingungen und anaeroben Bereichen mit metabolisch weniger aktiven Zellen (Drenkard, 2003).

Während planktonisch wachsende Zellen meist anfällig gegenüber Antibiotika sind, zeigen Biofilme eine charakteristische Resistenz gegenüber physikalischen und biochemischen Behandlungen sowie Antibiotika. Das Überleben in Gegenwart von antimikrobiellen Substanzen wird größtenteils dem Biofilmwachstum zugeschrieben, denn es konnte gezeigt werden, dass das Biofilmwachstum zu einer 10- bis 1000-fach erhöhten Resistenz gegenüber Antibiotika führen kann (Lam *et al.*, 1980; Mah & O'Toole, 2001; Nickel *et al.*, 1985; Singh *et al.*, 2000). Der genaue Mechanismus ist unbekannt. Möglicherweise führen physiologische Veränderungen während des Wachstums zu einer Stressantwort, die Schutzmechanismen aktiviert (Lambert, 2002).

Der diffusionsbedingte Nährstoffmangel im Biofilm führt zu einem verlangsamten Wachstum und geht mit einer geringeren metabolischen Aktivität einher, die häufig als Grund für eine Resistenz angenommen wird, da die meisten Antibiotika bei metabolisch aktiven Zellkomponenten wirken (Drenkard, 2003; Kim *et al.*, 2009; Stewart, 2002). Untersuchungen zeigten, dass ein Mangel an Sauerstoff, wie er auch in der CF-Lunge zu finden ist, zu einer höheren Resistenz von Biofilmen gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika führt (Borriello *et al.*, 2004; Field *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2005; Walters *et al.*, 2003). Bei *E. coli* konnte eine erhöhte Toleranz gegenüber Antibiotika in Biofilmen und stationären Kulturen durch die Bildung von Persister-Zellen, phänotypischen Varianten des Wildtyps, beobachtet werden, was auch für *P. aeruginosa* in Betracht gezogen wird (Drenkard, 2003; Spoering & Lewis, 2001; Spoering *et al.*, 2006). Im Allgemeinen wird ein Zusammenspiel unterschiedlichster Faktoren vermutet, die für die erhöhte Resistenz in der CF-Lunge verantwortlich sind (Drenkard, 2003). Eine Beteiligung von Muzinen wird ebenfalls in Betracht gezogen (Landry *et al.*, 2006). Gezielte Anwendung von Antibiotika zur Behandlung von Infektionen in der CF-Lunge haben einen Selektionsdruck ausgeübt und die Antibiotikaresistenz weiter gefördert (Lambert, 2002; Livermore, 2002). Wie bereits erwähnt, sind in

der CF-Lunge häufig Mutatorstämme zu finden. Diese können sich durch ihre hohe Mutationsrate schneller an die Umweltbedingungen und damit auch an Antibiotika anpassen. Dieser Effekt wird als Schlüsselmechanismus in der Entwicklung multiresistenter *P. aeruginosa*-Stämme in der CF-Lunge angesehen (Henrichfreise *et al.*, 2007; Macia *et al.*, 2005).

### 1.3.4 Therapie von *P. aeruginosa*-Infektionen

Die Therapie von chronischen *P. aeruginosa*-Infektionen in der CF-Lunge gestaltet sich schwierig und eine vollständige Eliminierung ist nicht möglich. Neben dem Einsatz von unterschiedlichsten Antibiotika kann durch das Inhalieren von vernebelter, rekombinanter menschlicher DNase I die Viskosität des Mucus verringert werden, um einen besseren Abtransport des Schleims zu ermöglichen (Gibson *et al.*, 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass extrazelluläre DNA für die Biofilmbildung notwendig ist und somit eventuell eine Möglichkeit aufweist um auch die Mikrokoloniebildung von *P. aeruginosa* zu unterbinden (Whitchurch *et al.*, 2002). Weiterhin konnte der Einsatz von *quorum sensing*-Blockern im Mausmodell erste Erfolge erzielen (Hentzer *et al.*, 2003).

## 1.4 Artifizielles Sputum-Medium (ASM)

Die Forschung im Bereich der CF-assoziierten *P. aeruginosa*-Infektionen ist problematisch, da es bislang kein optimales Tiermodell zur Simulation der CF-Lunge gibt. Das häufig verwendete CF-Mausmodell zeigt keine ausgeprägte Lungenerkrankung und ist nur ein begrenzter Ersatz, um die genauen Vorgänge zu untersuchen (O'Sullivan & Freedman, 2009). Des Weiteren haben unterschiedliche Gruppen versucht die Respirationstraktbedingungen von CF-Patienten zu simulieren.

Dabei konzentrierten sich einige Gruppen auf die, auf der Oberfläche von Schleimhäuten vorkommenden Muzine und deren Auswirkung auf das Wachstumsverhalten von *P. aeruginosa*. So brachten Landry *et al.* (2006) beispielsweise Muzin auf eine Glasoberfläche auf und konnten eine verstärkte Biofilmbildung und erhöhte Antibiotikaresistenz beobachten. Allerdings wurde das Experiment unter einem kontinuierlichen Mediumsfluss durchgeführt, der in der CF-Lunge nicht vorhanden ist. Auch charakteristische Bestandteile des CF-Mucus, wie entsprechende Salzkonzentrationen, fehlten.

Weiterhin untersuchten Matsui *et al.* (2006) die Auswirkungen unterschiedlicher Mucuskonzentrationen aus Zellkulturen auf das Wachstumsverhalten. Dabei stellen sie eine

Verbindung zwischen hohen Mucuskonzentrationen, dem damit verbundenen dichten Netz aus Muzinen und der charakteristischen Mikrokoloniebildung fest, die die Gruppe hauptsächlich auf die geringere Beweglichkeit der Bakterienzellen zurückführt. Nachteil dieses Medium ist neben dem, durch die Zellkulturen verursachten hohen technischen Aufwand, die ungenaue Zusammensetzung sowie nicht vorhandenen Modifikationsmöglichkeiten des sekretierten Zellkultur-Mucus.

Des Weiteren wurde sterilisiertes CF-Sputum in Konzentrationen von 10 % (in Puffer verdünnt) zur Untersuchung eingesetzt (Palmer *et al.*, 2005). Aufgrund von durchgeführten Transkriptomanalysen nehmen die Autoren an, dass *P. aeruginosa* in der CF-Lunge Aminosäuren als Kohlenstoffquelle verwendet. Durch die begrenzte Zugänglichkeit von Sputum und die starke Varianz zwischen unterschiedlichen Patienten je nach Vorkommen von Bakterien und Grad der Infektion, ist dieses Verfahren für umfangreiche Untersuchungen schwer zu realisieren. Auch sind durch unterschiedlichste Behandlungen der Patienten, wie z. B. mit Antibiotika, stark abweichende Ergebnisse zu erwarten.

In einer weiteren Untersuchung von Palmer *et al.* (2007a) wurde ein synthetisches CF-Sputum-Medium entwickelt, das aus Ionen wie z. B.  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  sowie Aminosäuren und Puffer zusammengesetzt ist. Zwar konnten in einer Transkriptomanalyse im Vergleich zur Genexpression während des Wachstums in 10-fach, in Puffer verdünntem CF-Sputum einige ähnliche Genexpressionen beobachtet werden, allerdings fehlen bei diesem Medium entscheidende Bestandteile des CF-Sputums wie Muzine, Lipide und Nukleotide, deren Auswirkungen auf das *P. aeruginosa*-Wachstum bereits bekannt sind. Neben dem bereits erwähnten Effekt von Muzinen sind Nukleotide beispielsweise für die Biofilmbildung notwendig und eine erhöhte Expression von Genen, deren Produkte im Abbau von Lipiden beteiligt sind, konnten in *in vivo* Transkriptionsstudien beobachtet werden (Son *et al.*, 2007; Whitchurch *et al.*, 2002). Basierend auf der Veröffentlichung von Palmer *et al.* (2007a) untersuchten Alvarez-Ortega & Harwood (2007) die Beteiligung terminaler Oxidasen während des Wachstums in diesem Medium und zeigten unterschiedliche Genregulationen bei sich verändernden Sauerstoffkonzentrationen. Außerdem bestätigten ihre Untersuchungen, dass die drei Oxidasen *cbb3-1*, *cbb3-2* und *cioA* für das Wachstum unter diesen Bedingungen essentiell sind.

In der Arbeit von Sriramulu *et al.* (2005) wurde ebenfalls ein Medium zur Simulation der CF-Lunge vorgestellt. In diesem, als artifizielles Sputum-Medium (ASM) bezeichneten, Medium wächst *P. aeruginosa* in, für die CF-Lunge charakteristischen Mikrokolonien. Das

Medium enthält die wichtigen Bestandteile des CF-Sputums wie entsprechende Ionenkonzentrationen, DNA, Lecithin, Muzine und Aminosäuren (Sriramulu *et al.*, 2005). Durch Variationen des Mediums, wie z. B. der Aminosäure-Konzentration, konnten deren Auswirkungen auf die Mikrokolonieform untersucht werden. Zwar sind durch die nicht exakt definierte Zusammensetzung der Muzine und des verwendeten Eigelbs als Lecithinquelle leicht abweichende Parameter in dem Medium möglich, allerdings bietet es im Vergleich zu anderen bereits veröffentlichten Medien eine, den Krankheitssymptomen nähere Simulation des CF-Sputums.

Nichtsdestotrotz werden die meisten Untersuchungen unter aeroben Bedingungen durchgeführt, obwohl seit längerem bekannt ist, dass *P. aeruginosa* in der CF-Lunge auch unter anaeroben Voraussetzungen wächst (Singh *et al.*, 2000). Ebenso werden die physiologischen Nitrat- und Nitrit-Konzentrationen der CF-Lunge größtenteils vernachlässigt (Grasemann *et al.*, 1998; Hassett, 1996; Linnane *et al.*, 1998).

Palmer *et al.* (2007b) sowie Alvarez-Ortega & Harwood (2007) untersuchten in diesem Zusammenhang erstmals mikroaerobe und anaerobe Bedingungen mit geringen Nitrat-Konzentrationen und fokussierten sich dabei ausschließlich auf die Energiegewinnung durch aerobe und anaerobe Respiration. Die Tatsache der erhöhten Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* während des anaeroben Wachstums in der CF-Lunge wurde bislang nicht untersucht.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Eine chronische Infektion mit *P. aeruginosa* in der Lunge von CF-Patienten führt zu erhöhter Morbidität und letztendlich zum Tod der Patienten. Während klinische CF-Isolate unter Laborbedingungen teilweise sensitiv gegenüber Antibiotika sind, ist es selbst durch Einsatz hoher Antibiotikakonzentrationen nicht möglich diese Stämme in der CF-Lunge abzutöten. Diese Befunde werfen die Frage auf, durch welche äußeren Faktoren diese erhöhte Antibiotikaresistenz in der CF-Lunge beeinflusst wird und welche Faktoren seitens der Bakterien dafür verantwortlich sind. Allerdings sind Untersuchungen direkt an der CF-Lunge von Patienten in diesem Zusammenhang nicht zu realisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb zur Simulation des CF-Lungenhabitats ein artifizielles Sputum-Medium (ASM) entwickelt, optimiert und verwendet werden. Dabei ist es erforderlich den *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 in diesem ASM auf die, für die CF-Lunge charakteristischen, antibiotikaresistenten Wachstumsphänotypen zu überprüfen. Durch Anwendung von Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalysen sollten dann an der beobachteten Antibiotikaresistenz beteiligte Faktoren identifiziert werden. In weiterführenden Mutantenstudien sollte die Auswirkung der identifizierten Faktoren auf die Antibiotikaresistenz exakt bestimmt werden. Die geplanten Untersuchungen sollten weiterhin Prozesse identifizieren, die für das Wachstum in ASM benötigt werden und somit erlauben Rückschlüsse auf genetische und metabolische Überlebensstrategien in der CF-Lunge zu ziehen.

Ein besonderer Fokus sollte auf klinische CF-Isolate mit Methioninauxotrophie gelegt werden. Das für die Methioninauxotrophie verantwortliche Gen sollte durch Komplementationsversuche mit einer genomischen PAO1-Cosmid Bank ermittelt und charakterisiert werden.

Zusammengefasst sollte die Grundlage für ein Modellsystem zur Untersuchung der Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge etabliert und angewendet werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Instrumente, Chemikalien und Materialien

#### 2.1.1 Instrumente

Tab. 1: Verwendete Instrumente sowie Modell und Hersteller.

<b>Instrument</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
2D-Kammer	Ettan DALT II System	Amersham
Agarosegel		
Dokumentationssystem	ChemiDoc	Bio-Rad
Elektrophoresekammer	Agagel Mini	Biometra
Anaerobenzelt	Forced Air Incubator	Coy Laboratory
Autoklav	EL 3850	Syntec
DNA Sequenzierung	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems
Elektroporation	Gene Pulser II™	Bio-Rad
GC-MS System	Finnigan Trace GC 2000/AS 2000	Thermo Electron
Gelgießkammer	DALT II Gel Caster 276 mm	Amersham
IEF-Kammer	Protean IEF Cell	Bio-Rad
Laserscanner	FX-Scanner	Bio-Rad
Massenspektrometer	Ultraflex	Bruker
PAGE	Mini Protean II	Bio-Rad
pH-Meter	pH 211 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments
Pipetten	Reference	Eppendorf
Rehydratisierungskammer	Immobiline Dry Strip Reswelling Tray	Pharmacia Biotech
Reinstwasseranlage	Synthesis A10	Millipore
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab
	Ultrospec 1100 pro	Amersham
Sterilwerkbank	Hera Safe	Heraeus
Thermocycler	Tgradient, Tpersonal	Biometra
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Vakuumkonzentrator	Concentrator 5301	Eppendorf
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	Model 572, ALJ 160-4NM	Kern
Wasserbad-Schüttler	Bench Top Shaker, Aquatron	Infors AG HT
Zentrifugen	Biofuge fresco, Megafuge 1.0 R	Heraeus
	Minispin®	Eppendorf

## 2.1.2 Chemikalien und Materialien

Tab. 2: Verwendete Chemikalien und Materialien sowie deren Hersteller.

Chemikalien und Materialien	Hersteller
Chemikalien und Enzyme	
GeneChip® Labeling Reagenz	Affymetrix
NeutrAvidin™	Molecular Probes
Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase	MBI-Fermentas
Restriktionsenzyme, CDP Star, SAP	New England Biolabs
RNase-freie DNase I	GE Healthcare
Reagenzien für die Sequenzierung, Hi-Di™	Applied Biosystems
SUPERaseIn RNase Inhibitor	Ambion
Taq DNA Polymerase, One-for-all-buffer	Amersham
SuperScript™ II Reverse Transkriptase, Random Primer, dNTPs	Invitrogen
SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain	Molecular Probes
Terminal Deoxynucleotide Transferase	Promega
Kits	
DIG-RNA Labeling	Roche
QIAquick Gel Extraction, PCR Purification, RNeasy mini	Qiagen
PlusOne 2D Quant	GE Healthcare
Molekulargewicht-Standards für Agarose- und Polyacrylamidgele	
DIG-labelt RNA Molecular Weight Marker II	Roche
GeneRuler™ DNA Ladder, MassRuler™ DNA Ladder	MBI Fermentas
Hyper Ladder V™	Bioline
Materialien	
Oligonucleotid-Primer	Metabion
<i>P. aeruginosa</i> GeneChips®	Affymetrix
Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt
Durapore Membranfilter 25 - 90 mm Ø, ZipTip® C18	Millipore
96- und 24-Well Platten	Thermo Fisher Scientific
Antibiokia-Testplättchen, 9 mm Ø	Macherey-Nagel
Verschlussfolie Breath-easy	Roth
Verschlussfolie AeraSeal™, steril	Sigma

Die hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Difco, Fluka, Merck, GE Healthcare, Riedel-de-Häen, Roth, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen.

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,5
DNA-Probenpuffer für Agarosegele:	30 µM Bromphenolblau 450 µM Xylen Cyanol FF 0,25 % Orange G 115 mM Saccharose
PBS-Puffer:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Kalium-Phosphat-Puffer:	100 mM, pH 7,4 800 ml 100 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> vorlegen und mit 100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> bis pH 7,4 auffüllen

## 2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Primer

Bei den molekularbiologischen Arbeiten wurden Bakterienstämme, Plasmide und Primer verwendet, die in den Tab. 3, 4 und 5 aufgeführt sind.

Tab. 3: Beschreibung der verwendeten Bakterienstämme und deren Herkunft.

Stamm	Beschreibung*	Referenz
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wildtyp	(Dunn & Holloway, 1971)
PA14	Wildtyp	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
NB94	PAO1 $\Delta$ PA1789 $\Delta$ PA3309 $\Delta$ PA4352	Nelli Bös
PAO1 $\Delta$ nap	PANQ02, PAO1 $\Delta$ napABCDEF	(Quäck, 2005)
PAO1 $\Delta$ nar	PANQ05, PAO1 $\Delta$ narGHIJ	(Quäck, 2005)
PAO1 $\Delta$ nap $\Delta$ nar	PANQ06, PAO1 $\Delta$ napABCDEF $\Delta$ narGHIJ	(Quäck, 2005)
PAO1 $\Delta$ arcDABC	PAO6251	(Gamper <i>et al.</i> , 1991)
BT2	klinisches Isolat aus CF-Patient	MHH
BT71	klinisches Isolat aus CF-Patient	MHH
BT72	klinisches Isolat aus CF-Patient	MHH
RN3	klinisches Isolat aus CF-Patient	MHH
RN45	klinisches Isolat aus CF-Patient	MHH
NN84	klinisches Isolat aus CF-Patient	MHH
65	klinisches Isolat aus CF-Patient	Gerd Döring, Tübingen
ST26	PAO1 $\Delta$ sahH	Diese Arbeit
ST28	PAO1 $\Delta$ glpD	Diese Arbeit
ST30	PAO1 $\Delta$ metF	Diese Arbeit
ST40	PAO1 $\Delta$ speE	Diese Arbeit
ST42	PAO1 $\Delta$ glpD $\Delta$ sahH	Diese Arbeit
ST44	PAO1 $\Delta$ sahH $\Delta$ speE	Diese Arbeit
ST48	PAO1 $\Delta$ oprM	Diese Arbeit
ST58	PAO1 $\Delta$ glpD $\Delta$ sahH $\Delta$ speE	Diese Arbeit
<i>E. coli</i>		
DH10B	F <sup>-</sup> mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 $\Delta$ (ara, leu) 7697 galU galK $\lambda$ rpsL nupG	GibcoBRL (Invitrogen)
S17	Tp <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> recA pro thi hsdR <sup>-</sup> M <sup>+</sup> RP4:2-Tc:Mu:Km:Tn7 $\lambda$ pir	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
ST18	S17 $\Delta$ hemA	Diese Arbeit (Thoma & Schobert, 2009)

\*Sm: Streptomycin; Tp: Trimethoprim

Tab. 4: Beschreibung der verwendeten Plasmide und deren Herkunft.

Plasmid	Beschreibung*	Referenz
pEX18Ap	Ap <sup>R</sup> , <i>oriT</i> <sup>+</sup> <i>sacB</i> <sup>+</sup> , Genaustauschvektor mit einer MCS von pUC18	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pPS858	Ap <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> , Quelle der Gentamicin Kassette	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pFLP2	Ap <sup>R</sup> , Quelle der FLP Rekombinase	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pKD13	Ap <sup>R</sup> , Teil eines Deletionssystem, trägt das <i>kan</i> Gen, was durch FRT-Erkennungssequenzen flankiert ist	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD46	Ap <sup>R</sup> , Teil eines Deletionssystem, trägt die Gene für das $\lambda$ Red Rekombinase System ( $\alpha$ , $\beta$ , <i>exo</i> ) unter der Kontrolle eines P <sub>araB</sub> Promoters mit temperatursensitivem ori	(Datsenko & Wanner, 2000)
pLAFR3-Cosmidbank	Tc <sup>R</sup> , pLAFR3-Derivate, die ein ca. 20 kb großes DNA-Insert aus dem <i>P. aeruginosa</i> PAO1-Genom enthalten	(Schobert, 1999)
pUCP20T	Ap <sup>R</sup> , mobilisierbarer Vektor für zahlreiche Wirt-sorgansimen	(West <i>et al.</i> , 1994)
pST06	Ap <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> , pEX18Ap mit 593 bp Promoterbereich des Gens <i>sahH</i> , Gm <sup>R</sup> - <i>gfp</i> aus pPS858 und 473 bp stromabwärts des kodierenden Bereichs von <i>sahH</i> zwischen <i>KpnI</i> und <i>XbaI</i> kloniert	Diese Arbeit
pST08	Ap <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> , pEX18Ap mit 445 bp Promoterbereich des Gens <i>glpD</i> , Gm <sup>R</sup> - <i>gfp</i> aus pPS858 und 499 bp stromabwärts des kodierenden Bereichs von <i>glpD</i> zwischen <i>KpnI</i> und <i>XbaI</i> kloniert	Diese Arbeit
pST10	pUC20T mit dem <i>metF</i> Gen zwischen <i>SacI</i> und <i>HindIII</i> kloniert	Diese Arbeit
pST12	Ap <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> , pEX18Ap mit 603 bp Promoterbereich des Gens <i>speE</i> , Gm <sup>R</sup> - <i>gfp</i> aus pPS858 und 544 bp stromabwärts des kodierenden Bereichs von <i>speE</i> zwischen <i>EcoRI</i> und <i>HindIII</i> kloniert	Diese Arbeit
pEX18ApGW: $\Delta$ oprM::FRT-Gm	Ap <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> , pEX18Ap mit Promoterbereich des Gens <i>oprM</i> , Gm <sup>R</sup> und Bereich stromabwärts des kodierenden Bereichs von <i>oprM</i>	Herbert Schweizer, Fort Collins, CO, USA

\*Ap: Ampicillin; Gm: Gentamicin; Tc: Tetracyclin

Tab. 5: Sequenzen der Primer I) zur Mutagenese der *P. aeruginosa* Gene *glpD*, *metF*, *sahH* und *speE*. (P1: Forward-Primer des Bereiches stromaufwärts des Startcodons; P2: Reverse-Primer des Bereiches stromaufwärts des Startcodons; P3: Forward-Primer des Bereiches stromabwärts des Stoppcodons; P4: Reverse-Primer des Bereiches stromabwärts des Stoppcodons) und II) zur Komplementation von *metF*. Die Sequenzen am 5'-Ende enthalten eine Schnittstelle für eine Endonuklease, die jeweils angegeben ist. Primersequenz zur III) Amplifizierung des *kan*-Gens von Plasmid pKD13, das zur Mutagenese des *hemA*-Gens aus *E. coli* verwendet wurde und IV) zur Sequenzierung von Inserts im pLAFR3. F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer.

Primer	Primersequenz (5'-3')	Restriktionsstelle
I) <i>glpD</i>		
P1	GCTCTAGAAGCGTCGTCAGCTCTGA	<i>KpnI</i>
P2	CGAGCTCCTGATCGCCAGCCAGAAAC	<i>SacI</i>
P3	CGAGCTCTGTGCGCTTGACTCATGTG	<i>SacI</i>
P4	CGGGGTACCTTCCTGGCCGCCGACTC	<i>XbaI</i>
<i>metF</i>		
P1	GGGGTACCGCCGATCACTACAACCAG	<i>KpnI</i>
P2	GAGCTCCGCGCCTCTTCTTGTTGATT	<i>SacI</i>
P3	GAGCTCTGGCGATCTGGAAGAATCTC	<i>SacI</i>
P4	GCTCTAGACGATGACGCCGGAGTTGA	<i>XbaI</i>
<i>sahH</i>		
P1	GGAGTACCACCAGGGCGCTGCACATC	<i>KpnI</i>
P2	CGAGCTCTGACAGCGCTCATGCGTAA	<i>SacI</i>
P3	CGAGCTCCGGACACCTATCGCTACTA	<i>SacI</i>
P4	GCTCTAGATGGCTGCAGGTTGGTGAT	<i>XbaI</i>
<i>speE</i>		
P1	GGAATTCTGACCTGCTGGCCGACGAT	<i>EcoRI</i>
P2	GCGGTACCTAGCCCTGGTACAGAGTT	<i>SacI</i>
P3	GGGGTACCAAGCAGGACAACGACTGA	<i>SacI</i>
P4	CCCAAGCTTCATGCCACCAGAACACC	<i>HindIII</i>
II) <i>metF</i>		
F	CGAGCTCAGCACTACCGCCAGTACTA	<i>SacI</i>
R	CCCAAGCTTTCGTGGATCGCGTGAGA	<i>HindIII</i>
III) <i>hemA</i>		
F	AACGTTGGTATTATTTCCCGCAGACATGACCCTTTTAGCAATTCCG GGGATCCGTCGACC	
R	AAAAAGAAAATGATGTACTGCTACTCCAGCCCGAGGCTGTGTGTA GGCTGGAGCTGCTGCTTC	
IV) pLAFR3		
F	GTTTTCCAGTCACGAC	
R	CAGGAAACAGCTATGAC	

## 2.3 Medien und Medienzusätze

### 2.3.1 Medien

Als Standardmedium für *E. coli* und *P. aeruginosa* wurde Luria Bertani (LB) verwendet.

LB-Medium:                      10 g Trypton  
                                       5 g Hefe-Extrakt  
                                       5 g NaCl  
                                       mit dH<sub>2</sub>O auf 1l auffüllen

Als Minimalmedium wurde für *P. aeruginosa* ein modifiziertes AB Minimalmedium verwendet (Heydorn *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 2006).

AB-Minimalmedium:            100 ml A10-Lösung  
                                       20 mM Glukose  
                                       1 ml Spurenelementlösung  
                                       1 mM MgCl<sub>2</sub>  
                                       100 µM CaCl<sub>2</sub>  
                                       25 µM FeSO<sub>4</sub>  
                                       mit dH<sub>2</sub>O auf 1l auffüllen

A10-Lösung:                      150 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
                                       335 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                       220 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                       500 mM NaCl  
                                       pH 7,0

Spurenelementlösung: 200 mg  $\text{CaSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
200 mg  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
20 mg  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   
20 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$   
20 mg  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
10 mg  $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
10 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   
5 mg  $\text{H}_3\text{BO}_4$   
mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 1l auffüllen, Sterilisation durch Filtration

Zur Simulation von Respirationstraktbedingungen wurde artifizielles Sputum-Medium (ASM) verwendet, basierend auf der Veröffentlichung von Sriramulu *et al.* (2005).

ASM 85,6 mM  $\text{NaCl}_2$   
29,5 mM KCl  
20 mM HEPES  
15  $\mu\text{M}$  DTPA  
150 ml Aminosäure-Lösung  
4 g Heringssperma-DNA  
5 g Muzin  
0,5 % steriles Eigelb  
pH 6,5 einstellen, mit reinst.  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1l auffüllen

Für die Aminosäure-Lösung wurden jeweils 250 mg von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren in 130 ml reinst.  $\text{H}_2\text{O}$  durch Zugabe von konzentrierter HCl gelöst und auf 150 ml mit reinst.  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt.

Das Muzin wurde zunächst in reinst.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, für eine Stunde bei 80 °C inkubiert, anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert und am folgenden Tag durch Autoklavieren sterilisiert.

Für feste Medien wurden 15 g Agar pro Liter zugesetzt.



### 2.3.2 Medienzusätze

Zusätze und Antibiotika wurden als konzentrierte Stammlösungen hergestellt und steril filtriert (siehe Tab. 6). Die Substanzen wurden den sterilisierten, auf etwa 50 °C abgekühlten, Medien zugesetzt.

Tab. 6: Übersicht über verwendete Zusätze und Konzentrationen der entsprechenden Lösungen.

Substanz	Lösungsmittel	Stammlösung- Konzentration	Endkonzentration	
			<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Antibiotika				
Carbenicillin	reinst. H <sub>2</sub> O	100 mg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
Tetracyclin	50 % EtOH	10 mg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
Gentamicin	reinst. H <sub>2</sub> O	30 mg/ml	10 µg/ml	80 µg/ml
Tobramycin	reinst. H <sub>2</sub> O	10 mg/ml		50 µg/ml
Rifampicin	100 % MetOH	100 mg/ml		100 µg/ml
Ciprofloxacin	reinst. H <sub>2</sub> O	2 mg/ml		
Meropenem	reinst. H <sub>2</sub> O	2 mg/ml		
Ceftazidim	10 % NaCO <sub>3</sub>	2 mg/ml		
Zusätze				
Glukose	dH <sub>2</sub> O	1 M		20 mM
Saccharose	dH <sub>2</sub> O	50 % (w/v)		5 % (w/v)
5-Amino- levulinsäure	reinst. H <sub>2</sub> O	50 mg/ml	50 µg/ml	
Methionin	reinst. H <sub>2</sub> O	20 mg/ml		20 µg/ml
Vitamin B12	reinst. H <sub>2</sub> O	100 µg/ml		10 pg-1 µg/ml
Ribitol	reinst. H <sub>2</sub> O	200 µg/ml		1 µg/ml
Ribavirin	reinst. H <sub>2</sub> O	100 µg/ml		
X-Gal	Dimethylformamid	20 mg/ml	40 µg/ml	
KNO <sub>3</sub>	reinst. H <sub>2</sub> O	1 M		10 µM -50 mM
NaNO <sub>2</sub>	reinst. H <sub>2</sub> O	1 M		130 µM

## **2.4 Mikrobiologische Techniken**

### **2.4.1 Sterilisation**

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien, Puffer und Glaswaren für 20 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen wurden steril filtriert (0,2 µm Porendurchmesser).

### **2.4.2 Bestimmung der Zelldichte**

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt. Es wurde davon ausgegangen, dass eine OD<sub>578</sub> von 1 einer Zellzahl von  $1 \times 10^9$  Zellen/ml entspricht.

### **2.4.3 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Kultur bzw. ein Filter aseptisch entnommen und eine Verdünnungsreihe mit PBS-Puffer hergestellt, auf geeignetem Medium ausplattiert und bei 37 °C für 24 bis 48 h aerob inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden gezählt und auf 1 ml Wachstumsmedium oder auf einen Biofilm hochgerechnet.

### **2.4.4 Wachstumsbedingungen**

Aerobe Bakterienkulturen wurden in Schikanekolben bei 200 rpm oder 24-Well Platten (Thermo Fisher Scientific) bei 300 rpm und bei 37 °C inkubiert. Für anaerobe Bakterienkulturen wurden aerobe Vorkulturen mit einer Einzelkolonie inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht geschüttelt. Von diesen wurden dann anaerobe Kulturen mit der gewünschten OD<sub>578</sub> inokuliert und in druckbeständigen Glasflaschen mit Silikongummistopfen ebenfalls bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. In Vergleichsexperimenten wurde mittels Sauerstoffelektrode festgestellt, dass der Sauerstoff nach 5 bis 10 min komplett verbraucht war. Sowohl aerobe als auch anaerobe Hauptkulturen wurden mit einer OD<sub>578</sub> von 0,05 angeimpft, wenn nicht anders angegeben.

Zur Inkubation von Koloniebiofilmen wurden Durapore Membranfilter (Millipore) aus PVDF (Polyvinylidenfluorid) mit einer Porengröße von 0,22 µm verwendet, um einen Transfer auf frische Agar-Platten zu ermöglichen. Für die Herstellung der Koloniebiofilme wurde die OD<sub>578</sub> einer aeroben Vorkultur auf 0,0004 berechnet, mit entsprechendem Medium verdünnt und die Membranfilter mit ca. 41 Zellen pro mm<sup>2</sup> inokuliert. Je nach Filtergröße wurden unterschiedliche Zellzahlen aufgetragen. Als Standard wurden 50 µl ver-

dünnter Vorkultur mit ca. 20 000 Zellen auf einem Membranfilter mit 25 mm Durchmesser gegeben. Die Membranfilter wurden auf Whatman-Papier gelagert bis der Flüssigkeitsfilm vollständig eingezogen war, dann auf Agar-Platten mit ca. 1 cm Schichtdicke überführt und bei 37 °C inkubiert. Um anaerobe Bedingungen für entsprechende Experimente zu gewährleisten wurden die Agar-Platten zuvor 24 h unter anaeroben Bedingungen gelagert und auch der Transfer der Filter unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Filter wurden täglich auf frische Platten transferiert. Die Inkubationszeiten wurden entsprechend der Experimente variiert und sind jeweils angegeben.

#### **2.4.5 Glycerinkulturen**

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 850 µl von einer Bakterien-Übernachtskultur mit 150 µl sterilem 100 %igem Glycerin versetzt, 20 min auf Eis und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### **2.4.6 Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC)**

Zur Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration von Substanzen wurde eine *P. aeruginosa*-Übernachtskultur 1:100 in LB-Medium verdünnt und je 1 ml in ein Well einer 24-Well-Platte gefüllt sowie die zu testende Menge Substanz hinzugefügt. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Um eine gleichmäßige Sauerstoffversorgung der Kulturen zu gewährleisten und die Verdunstung des Mediums zu unterbinden, wurden zwei unterschiedliche, sterile und durchstechbare Folien auf die 24-Well Platten aufgebracht. Zuerst wurde eine luftdurchlässige Verschlussfolie (AeraSeal™, Sigma) aufgeklebt und darauf eine gasdurchlässige Verschlussfolie (Breath-easy, Roth) aufgebracht. Nach 16-stündiger Inkubation bei 37 °C und 300 rpm wurde die Kultur auf eine Trübung durch Wachstum überprüft. Die niedrigste Konzentration der zu testenden Substanz, bei der keine Trübung mehr auftrat, wurde als minimale inhibitorische Konzentration definiert.

#### **2.4.7 Test der Antibiotikaresistenz von Koloniebiofilmen**

Um die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* Koloniebiofilmen nach einer Antibiotikabehandlung zu testen, wurden die Koloniebiofilme zunächst auf Medium ohne Antibiotika inkubiert. Die Inkubationszeiten wurden den Experimenten entsprechend variiert und sind jeweils angegeben. Dann wurden die Biofilme für 12 h auf Agar mit der 10-fachen MIC eines Antibiotikums (mit Ausnahme von Rifampicin) inkubiert. Die Lebendzellzahl (siehe

2.4.3) pro Filter wurde bestimmt und gegebenenfalls wurde die Überlebensrate im Verhältnis zu unbehandelten Biofilmen bestimmt.

### 2.4.8 Durchlässigkeitstest

Um zu überprüfen, ob Antibiotika im Medium frei diffundieren können oder durch verwendete PVDF-Filter oder gewachsene Biofilme zurückgehalten werden, wurde ein Test auf der Basis von Anderl *et al.* (2000) mit Antibiotika-Testplättchen durchgeführt.

Die Diffusion im Medium wurde überprüft, indem Antibiotika-Testplättchen direkt auf dem Medium platziert wurden. Außerdem wurden getränkte Antibiotika-Testplättchen auf PVDF-Filter platziert um die Durchlässigkeit der Filter zu prüfen. Anschließend erfolgte jeweils eine Inkubation bei 37 °C für 12 h. Um falsche Ergebnisse durch auftretende Kapillarkräfte zu verhindern, wurden die Antibiotika-Testplättchen zuvor mit 50 µl Medium getränkt. Der Aufbau des Durchlässigkeitstest für Biofilme ist schematisch in Abb. 5 zu sehen. Der auf einem PVDF-Filter (D) bis zur Stationärphase gezüchtete Biofilm (C) wird für 12 h auf eine antibiotikahaltige Agar-Platte (E) transferiert. Ein weiterer, kleiner PVDF-Filter (B) wird auf dem Biofilm platziert und darauf das flüssigkeitsgetränkte Antibiotika-Testplättchen (A). Nach der Inkubation wurden die Antibiotika-Testplättchen abgenommen und auf eine LB-Agar platziert, auf die zuvor 100 µl einer *E. coli* DH10B-Kultur mit einer OD<sub>578</sub> von 1,0 ausplattiert wurde. Diese Platten wurden 24 h bei 37 °C inkubiert und die Hemmhofbildung im Vergleich zu antibiotikage tränkten Referenz-Testplättchen untersucht.

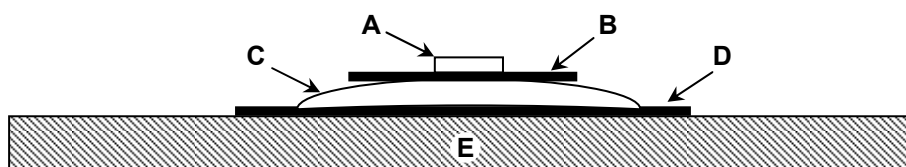


Abb. 5: Schematische Darstellung des Durchlässigkeitstests nach Anderl *et al.* (2000). Der Biofilm (C) wurde auf einem PVDF-Filter (25 mm Ø, D) gezüchtet und auf eine antibiotikahaltige Agar-Platte (E) platziert. Ein weiterer PVDF-Filter (10 mm Ø, B) wurde auf dem Biofilm platziert und darauf das flüssigkeitsgetränkte Antibiotika-Testplättchen (A) gelegt.

### 2.4.9 Quantifizierung von Pyocyanin

Zur Bestimmung der Menge des von *P. aeruginosa* gebildeten Pigments Pyocyanin in Flüssigkulturen wurde zunächst die Kultur steril filtriert um einen zellfreien Extrakt zu erhalten. Pyocyanin wurde anschließend durch eine Chloroform-Extraktion isoliert. Dazu wurde 1 ml steril filtrierter Kulturüberstand in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 250 µl Chloroform versetzt und 2 min stark geschüttelt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT

wurde die untere chloroformhaltige Phase vorsichtig abgenommen, die obere wässrige Phase erneut mit 250 µl Chloroform versetzt und wie beschrieben behandelt. Da während der Extraktion ein weißer Niederschlag auftrat, wurde die Probe für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Minispin) und die weiße Interphase verworfen. Diese Prozedur wurde viermal wiederholt. Das hydrophobe Pyocyanin wurde in der organischen Phase angereichert und konnte mittels Absorptionsmessung bei 695 nm gegen Chloroform bestimmt werden.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

Die Protokolle der meisten beschriebenen molekularbiologischen Methoden basieren auf Sambrook (2001).

### 2.5.1 Isolation und Restriktion genomischer DNA

Zur Präparation der genomischen DNA wurden 4 ml *P. aeruginosa* PAO1 Kultur bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Die Kulturen wurden zentrifugiert (13000 rpm, 2 min, 4 °C, Biofuge fresco), das Bakteriensediment wurde in 700 µl Puffer P1 (siehe Abschnitt 2.5.3) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 25/24/1, pH 7,4) hinzu gegeben und intensiv geschüttelt. Zur Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4 °C, Biofuge fresco). Die obere, DNA-haltige Phase wurde entnommen. Um die DNA von Proteinen zu trennen, wurde die Behandlung mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zweimal wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 700 µl Chloroform gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde zur Fällung der DNA die obere Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 60 µl einer 3 M Natrium-Acetat Lösung (pH 5) sowie 700 µl Isoamylalkohol versetzt. Die gefällte DNA wurde zentrifugiert (13000 rpm, 20 min, 4 °C). Die sedimentierte DNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, in 100 µl Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

### 2.5.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch Ermittlung der Extinktion bei 260 nm (Ultraspec 1100 pro), mit dH<sub>2</sub>O als Referenz. Eine Extinktion von 1 wurde einer Konzentration von 50 µg/µl gleichgesetzt. Um den Reinheitsgrad der DNA zu bestimmen

wurde parallel eine Messung bei OD<sub>280</sub> durchgeführt. In einer nahezu proteinfreien Lösung liegt der Quotient aus OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> zwischen 1,8 und 2,0. Weiterhin wurde die DNA Konzentration mittels Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000, Peqlab) bestimmt.

### 2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR („Polymerase chain reaction“) wurden unterschiedliche DNA-Sequenzen direkt aus dem *P. aeruginosa* Chromosom amplifiziert. Die PCR wurde nach folgendem Temperaturprogramm in einem PCR-Cycler durchgeführt: 5 min Denaturierung der chromosomalen DNA bei 98 °C, gefolgt von 30 Zyklen mit 1-minütiger Denaturierung bei 96 °C, 1-minütiger Anlagerungszeit der Primer bei primerabhängiger Temperatur und 1 - 3-minütiger Kettenverlängerung bei 72 °C. Der letzte 5-minütige Schritt bei 72 °C diente der vollständigen Synthese des Gegenstrangs. Bei unbefriedigenden Ausbeuten an PCR-Produkt wurde durch Zugabe von 3 % (v/v) DMSO versucht, die Ausbeute zu erhöhen. Die PCR-Produkte wurden standardmäßig mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers für die weiteren Reaktionen aufgereinigt.

RCR-Reaktionsansatz:	10 ng DNA
	5 µl 10× PCR-Puffer
	20 pmol Primer
	200 µM dNTPs
	0,5 U Taq-Polymerase
	mit reinst. H <sub>2</sub> O auf 50 µl auffüllen

### 2.5.4 Sequenzierung

Für die Sequenzierung der Inserts der Plasmide, die eine Methioninauxotrophie komplementieren können, wurde die nicht radioaktive Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) benutzt. Die Synthese des komplementären DNA Stranges zum Matrizenstrang erfolgt analog zur PCR, mit dem Unterschied, dass für die Sequenzierungs-PCR nur ein Primer eingesetzt wurde. Ein weiterer Unterschied zur PCR besteht in den geringeren Mengen an Desoxyribonukleotiden (dNTPs) und den zusätzlichen 2',3'-Dideoxynukleotiden (ddNTPs). Den ddNTPs fehlt die 3'-Hydroxygruppe, daher führt deren Einbau zum Abbruch der Kettenreaktion, da keine Phosphodiesterbindung zu einem weiteren dNTP geknüpft werden kann. Der Einbau der ddNTPs erfolgt zufällig und sorgt so für die Entstehung von Fragmenten unterschiedlicher Länge. Die Auftrennung erfolgt durch eine

Kapillar-Elektrophorese in einem automatischen Sequenzierer. Die ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und emittieren daher unterschiedliche Spektren, wenn sie durch ein Laserlicht angeregt werden. Die Auswertung erfolgt automatisch über eine gerätespezifische Software.

Sequenzierreaktion (10 µl):	2 µl „Premix“ (Applied Biosystems)
	2 µl 5× Puffer
	1 µg Plasmid DNA
	1 µl Primer (10 pmol)
	mit reinst. H <sub>2</sub> O auf 10 µl auffüllen

Die Sequenzier-PCR wurde nach folgendem Temperaturprogramm in einem PCR-Cycler durchgeführt: 1 min Denaturierung der Plasmid-DNA bei 96 °C, gefolgt von 25 Zyklen mit 25-sekündiger Denaturierung bei 96 °C, 15-sekündiger Anlagerungszeit der pLAFR3-spezifischen Primer bei 50 °C und 4-minütiger Kettenverlängerung bei 60 °C. Die Primer binden kurz vor und nach dem pLAFR3 Polylinker und ermöglichen so die Sequenzierung des Inserts.

Zur Aufreinigung der DNA wurde der PCR Ansatz in 90 µl reinst. H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 10 µl 3 M Natriumacetat, 250 µl Ethanol (100 %) und 1 µl Glycogen (20 µg/µl) für 20 min bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 13000 rpm (Eppendorf Minispin) zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und dann getrocknet. Schließlich wurde die DNA in 12,5 µl HiDi™ (Sequenzierreagenz, Applied Biosystems) aufgenommen und in spezielle Sequenziergefäße überführt, bevor die Auswertung am Sequenziergerät erfolgte (Genetic Analyser ABI Prism™ 310, Applied Biosystems).

### **2.5.5 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Die Restriktion von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen in den entsprechenden Restriktionspuffern nach Angaben der Hersteller. Die Inkubationsdauer bei 37 °C lag zwischen einer und vier Stunden. Die Ansätze wurden anschließend mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 2.5.6 Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch mit Hilfe von Agarose-Gelen (1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer) aufgetrennt. Als Größenvergleich diente der DNA-Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Zur Visualisierung der DNA wurde das Gel nach der Elektrophorese für 5 bis 20 min in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) inkubiert und dieses unter UV-Belichtung bei 266 nm dokumentiert. Die Reinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte nach der elektrophoretischen Trennung. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden unter möglichst kurzzeitiger UV-Exposition ausgeschnitten und mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 2.5.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Zunächst wurden dazu der Vektor und die zu ligierenden DNA-Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. Gegebenenfalls wurde der Vektor anschließend mit einer Phosphatase (SAP) (3,5 Units) 90 min bei 37 °C dephosphoryliert. Nach 10-minütiger Inaktivierung der SAP bei 65 °C wurden die DNA-Fragmente mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Vor der Ligation wurden die DNA-Konzentration der zu ligierenden Fragmente photometrisch bestimmt und je 100 ng der Vektoren und 200 ng der Inserts mit dH<sub>2</sub>O versetzt und für 10 min bei 45 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurden Puffer und Enzyme in entsprechenden Konzentrationen hinzugefügt und für eine Stunde bei 17 °C inkubiert. Die Ligation erfolgte im entsprechenden Ligationspuffer nach Angaben des Herstellers.

### 2.5.8 Transformation von *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde eine Vorkultur der *E. coli* Stämme DH10B, S17 oder ST18 aerob bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Von dieser wurden 200 ml Hauptkultur in Schikanekolben mit einer OD<sub>578</sub> = 0,05 angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>578</sub> von etwa 0,6 inkubiert. Nach Erreichen der Zelldichte wurde die Kultur auf Eis 15 min abgekühlt und anschließend zentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4 °C, Megafuge 1.0 R). Das Bakteriensediment wurde in 20 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> und 10 % Glycerol resuspendiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakteriensediment in 2 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> und 10 % Glycerol gelöst, in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert. Zur Transformation wurde ein Aliquot der gewünschten *E. coli* Zellen für 15 min auf Eis aufgetaut, dann mit 5 µl Ligationsansatz bzw. 1 µg Plasmid ver-



setzt und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde mittels Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C erreicht. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl LB-Medium versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Von dem Transformationsansatz wurden 100 µl bis 200 µl auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.5.9 Diparentales Mating mit *P. aeruginosa*

*E. coli* S17 und *E. coli* ST18 enthalten die für eine Konjugation notwendigen *tra*-Gene. Dadurch kann ein Vektor aus *E. coli* durch eine Konjugation auf *P. aeruginosa* übertragen werden. Dazu wurden *P. aeruginosa* und *E. coli* Übernachtskulturen mit dem zu übertragenden Vektor bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Für das diparentale Mating wurden 2 ml *E. coli* und 200 µl *P. aeruginosa* Übernachtskultur für je 1 min bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Zellen wurden in je 50 µl LB-Medium resuspendiert, vereinigt, als Tropfen auf LB-Agar gegeben, unter der Sterilwerkbank getrocknet und bei 37 °C für 6 h inkubiert. Während dieser Zeit wurde das mobilisierbare Plasmid von *E. coli* in *P. aeruginosa* übertragen. Die Bakterien wurden anschließend mit einer sterilen Impföse von der Platte gekratzt und in 500 µl LB-Medium resuspendiert. Zwischen 50 µl und 200 µl der Zellsuspension wurden auf AB-Agar ausplattiert, wenn das Mating mit *E. coli* S17 als Donor durchgeführt wurde. Gleiche Mengen Zellsuspension wurden auf LB-Agar aufplattiert bei der Verwendung von *E. coli* ST18 als Donor. Des Weiteren wurden entsprechende Antibiotika zur Selektion von *P. aeruginosa* mit Vektor verwendet und die Agar-Platten bei 37 °C für 24 bis 48 h inkubiert.

### 2.5.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*-Klonen nach einer Transformation wurde eine Mini-Präparation nach der alkalischen Lyse-Methode durchgeführt. Dazu wurden 5 ml Übernachtskulturen mit je einer Einzelkolonie inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden zentrifugiert (13000 rpm, 2 min, 4 °C, Biofuge fresco) und das Bakteriensediment wurde in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer P2 und vorsichtigem Invertieren wurde 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 300 µl Puffer P3 zugegeben, vorsichtig invertiert und nochmals 5 min bei RT inkubiert. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 20 min, 4 °C) wurde der Überstand zur Ausfällung der Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol gemischt, 10 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C). Das DNA-Sediment wurde mit

70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, in 50 µl Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

Puffer:	P1:	50 mM Glucose
		25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
		10 mM EDTA (pH 8,0)
	P2:	0,2 M NaOH
		1 % SDS
	P3:	3 M Na-Acetat (pH 5,3)

Nach der Präparation wurden Restriktionsansätze zur Überprüfung der Klone durchgeführt:

Restriktionsansätze:	2 µl Plasmid-DNA
	2 µl 10× Restriktionspuffer (NEB)
	1 µl Enzym I*
	1 µl Enzym II*
	14 µl reinst. H <sub>2</sub> O
	<hr/> 20 µl Gesamtvolumen

\*Enzymmengen der jeweiligen Enzyme wurden nach Angaben des Herstellers variiert.

## 2.5.11 Konstruktion von Deletionsmutanten

### 2.5.11.1 Konstruktion einer *hemA*-Mutante in *E. coli* S17

Der Transfer von DNA in Prokaryoten und ist ein wichtiger Schritt um genetische Arbeiten zu ermöglichen. Neben Transduktion und Transformation ist die Konjugation durch diparentales Mating die Methode der Wahl, da Plasmide von erheblicher Größe in großer Frequenz übertragen werden können. Sehr häufig wird dafür als Donor *E. coli* S17 (Simon *et al.*, 1983) verwendet. Der Nachteil dieser Methode ist die Selektion des auxotrophen *E. coli*-Stammes, die häufig mit Chloramphenicol oder durch Verwendung von Minimalmedium durchgeführt wird. Dieses Vorgehen kann je nach Selektionsmethode zu Veränderungen des Rezipienten oder zu langen Versuchszeiten führen. Außerdem ist diese Methode nicht geeignet für auxotrophe Rezipienten.

Durch die Verwendung einer *E. coli* S17  $\Delta hemA$  (ST18) Mutante für diparentale Matings entfällt die Selektion von *E. coli*, da ein Wachstum des Stamms ohne Zugabe von 5-Aminolevulinsäure nicht möglich ist. Von Vorteil ist die erhebliche Zeitersparnis während der Experimente und außerdem sind auch auxotrophe Stämme mit Hilfe dieses Stammes für den DNA-Transfer mittels diparentalem Mating besser zugänglich.

Zur Erstellung einer *E. coli* S17  $\Delta hemA$  Deletionsmutante wurde die Methode von Datsenko & Wanner (2000) verwendet. Dabei wird das Zielgen mit Hilfe des  $\lambda$  Phagen Rekombinationssystems durch eine Kanamycin-Resistenzkassette (*kan*) ausgetauscht. Das *kan*-Gen, welches durch FRT-Erkennungssequenzen (siehe Abschnitt 2.5.12) flankiert ist, kann nach der erfolgreichen Mutagenese durch die Fli-Rekombinase deletiert werden, wodurch eine unmarkierte Mutante erzeugt wird (siehe Abschnitt 2.5.12).

Das auf dem Plasmid pKD13 kodierte Kanamycinresistenzgen *kan* wurde mit Hilfe der Primer F und R (Tab. 5) amplifiziert, deren 5'-Bereich homolog zum *kan*-Gen ist und deren 3'-Bereich homolog zu den flankierenden Bereichen des *hemA*-Gens im *E. coli*-Genom ist (Abb. 6A). Das PCR-Produkt besteht aus der Kanamycin-Resistenzkassette, die von 40 bp und 43 bp großen Sequenzen flankiert ist, die homolog zu den angrenzenden Bereichen H1 und H2 des *hemA*-Gens im *E. coli*-Genom sind und einen Austausch des *hemA*-Gens durch homologe Rekombination ermöglichen (Abb. 6B). Um das Plasmid pKD13 im PCR-Ansatz zu eliminieren, wurde ein Restriktionsverdau mit *DpnI* (10 U) durchgeführt, dass nur methylierte DNA schneidet und damit spezifisch pKD13 zerstört.

Bevor *E. coli* S17 mit dem linearen PCR-Produkt transformiert werden konnte, musste zuerst eine Transformation mit dem Plasmid pKD42 (Datsenko & Wanner, 2000) durchgeführt werden, um höhere Transformationsraten zu erreichen (siehe unten). Aufgrund des temperatursensitiven Replikationsstarts dieses Plasmids musste auf eine Transformation wie unter Abschnitt 2.5.8 beschrieben, verzichtet und stattdessen die im Folgenden beschriebene Elektroporation durchgeführt werden.

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* S17 Zellen wurde eine Einzelkolonie auf LB-Agar ausgestrichen und bei 37 °C für 16 h inkubiert. Vom Agar wurde mit einer sterilen Impföse etwas Bakterienmaterial abgenommen, in 500  $\mu$ l sterilem dH<sub>2</sub>O resuspendiert und 1 min bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal gewaschen, bevor sie in 50  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O resuspendiert und für die Transformation eingesetzt wurden. Die Zellen wurden mit pKD42 Plasmid-DNA versetzt, in 1 mm

Elektroporationsküvetten überführt und bei 1,9 kV, 200  $\Omega$  und 25  $\mu$ F im Gene Pulser<sup>TM</sup> elektroporiert. Nach der anschließenden Regenerationsphase von 1 h bei 30 °C und 500 rpm wurden 100  $\mu$ l auf LB-Agar mit Carbenicillin ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert um pKD42-tragende Klone identifizieren zu können.

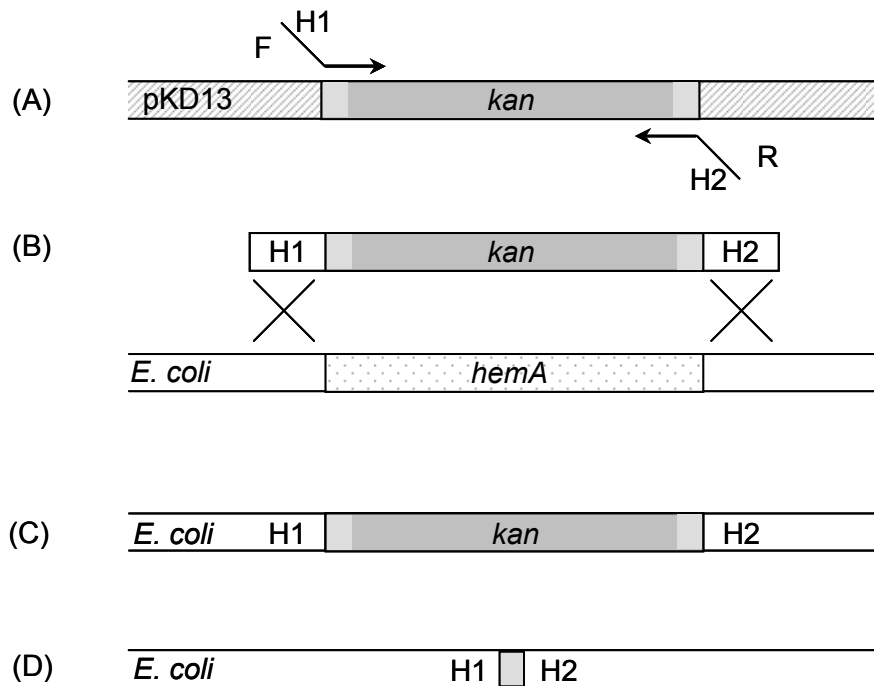


Abb. 6: Schematische Darstellung zur Herstellung der  $\Delta$ hemA-Mutante in *E. coli* S17. (A) Mit Hilfe der Primer F und R wird das Resistenzgen *kan* (dunkelgrau) mit flankierenden FRT-Sequenzen (hellgrau) vom Plasmid pKD13 amplifiziert. Die Primer enthalten sowohl Sequenzen die komplementär zum *kan*-Gen als auch zu flankierenden Bereichen (H1 und H2) des *hemA*-Gens im *E. coli*-Genom sind. (B) Die homologe Rekombination der Bereiche H1 und H2 des linearen PCR-Produkts und entsprechender Sequenzen im *E. coli*-Genom findet mit Hilfe des  $\lambda$  Phagen Rekombinationssystems statt. (C) Dabei wird das *hemA*-Gen durch das *kan*-Gen ersetzt, welches die Kanamycin-Resistenz kodiert. (D) Durch Behandlung mit der Flp-Rekombinase wurde das *kan*-Gen entfernt und eine einzelne FRT-Sequenz bleibt im Genom zurück.

Auf dem Plasmid pKD42 sind Gene der  $\lambda$  Phagen Rekombinations-Maschinerie kodiert, wie  $\gamma$ , dass Gam kodiert und die wirtseigenen Exonuklease V inhibiert sowie Bet ( $\beta$ ) und Exo (*exo*), die die Rekombination der homologen DNA-Bereiche des PCR-Produkts mit der entsprechenden Sequenz im Genom erleichtern. Dieses System wurde verwendet um die Aktivität des *E. coli* S17 Rec-Systems zu verringern, dass für die Degradation von linearen DNA Fragmenten verantwortlich ist und somit bessere Transformations- und Rekombinationsraten ermöglicht. Da die Gene auf dem pKD42 unter einem Arabinose-abhängigen Promoter stehen werden zur Herstellung elektrokompenter Zellen entsprechende Klone auf LB-Agar mit 1 mM Arabinose ausplattiert und wie oben beschrieben mit dem linearen PCR-Fragment aus *kan*-Gen sowie den Bereichen H1 und H2 transformiert.

Kanamycin-resistente Klone wurden auf LB-Agar mit 50 µg/ml selektioniert. Die Inkubation der Zellen bei 37 °C sorgte für die Zerstörung des temperatursensitiven Replikationsstarts von pKD42, was durch Ausplattierung auf LB-Agar mit Carbenicillin überprüft wurde. Die erfolgreiche Rekombination wurde mit Hilfe der PCR kontrolliert (Abb. 6C).

Die Kanamycin-Resistenzkassette wurde aus dem Genom mithilfe des pFLP2 Plasmids, das für eine FLP-Rekombinase kodiert, entfernt (Abb. 6D). Die unmarkierte Mutante wurde *E. coli* ST18 genannt und für diparentale Matings verwendet. Der Stamm zeigt nahezu die gleiche Matingeffizienz wie *E. coli* S17 (Thoma & Schobert, 2009). Der Stamm *E. coli* ST18 wurde in der deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ hinterlegt (DSMZ 22074).

#### 2.5.11.2 Konstruktion von *P. aeruginosa*-Deletionsmutanten

Zur Konstruktion von Deletionsmutanten wurde nach der Methode von Hoang *et al.* (1998) verfahren. Dabei wird das Zielgen durch eine Gentamicin-Resistenzkassette ersetzt. Aus dem Chromosom von *P. aeruginosa* wurden mittels PCR die Bereiche stromaufwärts des jeweiligen Startcodons und stromabwärts des jeweiligen Stoppcodons amplifiziert. Die Primer zur Herstellung der jeweiligen PCR-Fragmente sind in Tab. 5 zusammengefasst. Die jeweiligen 5'-Enden der verwendeten Primer enthielten ausgewählte Schnittstellen für bestimmte Endonukleasen um eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen (Tab. 5).

Nach der Amplifikation der flankierenden Bereiche der proteinkodierenden Sequenz durch eine PCR, wurden die Fragmente mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten. Die geschnittenen Fragmente wurden in den Suicide-Vektor pEX18Ap ligiert, zugleich wurde die Gentamicin-Resistenzkassette aus pPS858 mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und zwischen die Fragmente ligiert. Die beiden amplifizierten Bereiche wurden mit der gleichen Orientierung zueinander in den Vektor kloniert, wie sie im Genom von *P. aeruginosa* vorliegen.

Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH10B transformiert. Die Selektion auf plasmidtragende Klone fand auf LB-Agar mit Gentamicin statt. Die Plasmide von positiven Klonen wurden isoliert (Abschnitt 2.5.10) und mittels Restriktionsanalyse überprüft.

*E. coli* ST18 wurde mit den hergestellten Suicide-Vektoren pST06 (*sahH*-Mutagenese), pST09 (*metF*-Mutagenese), pST08 (*glpD*-Mutagenese) und pST012 (*speE*-Mutagenese) transformiert und die Plasmide wurden anschließend durch ein diparentales Mating in *P. aeruginosa* übertragen. Der Konjugationsansatz wurde auf LB-Agar mit Gentamicin

ausplattiert. Weil die verwendeten Suicide-Vektoren in *P. aeruginosa* nicht frei replizierbar sind, ist ein Wachstum von *P. aeruginosa* mit Gentamicin nur dann möglich, wenn der entsprechende Suicide-Vektor mit der Gentamicin-Resistenzkassette in das Genom von *P. aeruginosa* integriert wurde. Diese Integration kann durch eine homologe Rekombination in den Bereichen stromaufwärts oder stromabwärts der proteinkodierenden Sequenz des auszuschaltenden Gens stattfinden, weil diese Bereiche homolog zu den im Suicide-Vektor enthaltenen Amplifikaten sind. Die Integration des Vektors durch einen Single-Crossover verleiht eine Resistenz gegen Gentamicin, erzeugt jedoch keine Deletion des Gens.

Eine Deletion, bei dem die Gentamicin-Resistenzkassette das Zielgen ersetzt, erfolgt erst durch ein zweites Crossover-Ereignis im zweiten homologen Bereich. Auf dieses Ereignis konnte durch den im pEX18Ap-Vektor enthaltenen negativen Selektionsmarker, das *sacB* Gen, selektiert werden. Das *sacB*-Gen kodiert eine Levansucrase, die für die Zelle ein toxisches Produkt aus Saccharose bildet (Hoang *et al.*, 1998). Kolonien, die auf LB-Agar mit Saccharose und Gentamicin Wachstum zeigten und sensitiv gegenüber Carbenicillin waren, wurden vereinzelt und als Glycerinkulturen aufbewahrt.

### 2.5.12 Entfernen von Resistenzkassetten aus dem Genom

Die Gentamicin-Resistenzkassette aus pPS858 sowie die Kanamycin-Resistenzkassette des Vektors pKD13 (Abschnitt 2.5.11.1) sind so konstruiert, dass sie von FRT-Sequenzen flankiert sind. Diese FRT-Sequenzen sind 65 bp große Erkennungssequenzen für die Flp-Rekombinase, die eine DNA-Sequenz von bis zu 10 kb aus dem Genom deletiert, wenn diese von Erkennungssequenzen flankiert ist (Cherepanov & Wackernagel, 1995).

*E. coli* ST18 wurde mit dem Plasmid pFLP2 transformiert, das für die Flp-Rekombinase kodiert, dann auf Carbenicillin selektioniert und nach mehrfachem Überimpfen auf LB-Agar inkubiert. Kolonien, die sensitiv gegenüber Kanamycin und Carbenicillin waren, wurden mit PCR auf die Deletion des *kan*-Gens überprüft und als Glycerinkulturen aufbewahrt.

Zum Herausschneiden der Gentamicin-Resistenzkassette aus dem *P. aeruginosa*-Genom wurde das Plasmid pFLP2 mittels diparentalem Mating in die Mutanten eingebracht. Abschließend wurden die Klone zur Überprüfung, ob die Rekombinase die Gentamicin-Resistenzkassette entfernt hat und das Plasmid pFLP2, was ebenfalls ein *sacB*-Gen kodiert (siehe Abschnitt 2.5.11.2), eliminiert wurde, auf Sensitivität gegenüber den Antibiotika Gentamicin und Carbenicillin sowie auf ein Wachstum auf Saccharose getestet. Zur Überprüfung der Mutanten wurde mit Primern, die jeweils stromaufwärts bzw. stromabwärts

der flankierenden Bereiche im Genom binden, eine PCR durchgeführt. Somit konnte eine erfolgreiche Deletion des Zielgens nachgewiesen werden. Im Genom blieb nur eine einzelne FRT-Sequenz von ca. 150 bp zurück.

### **2.5.13 Komplementation und Identifikation einer Mutation durch Transfer einer Genbank in *P. aeruginosa***

Klinische Isolate aus CF-Patienten sind häufig auxotroph. Um das verantwortliche Gen für die Methioninauxotrophie zu ermitteln wurde eine Komplementation mit einer *P. aeruginosa*-Genbank durchgeführt, die auf Cosmiden vorlag. Anschließend wurden prototrophe Klone isoliert, das entsprechende Cosmid isoliert und sequenziert. Dazu wurde die von Schobert (1999) hergestellte Cosmidbank basierend auf dem Plasmid pLAFR3 verwendet. Die Cosmidbank befindet sich in *E. coli* S17 und das Experiment wurde wie in Schobert (1999) beschrieben, durchgeführt.

Es wurden 5 ml LB-Kultur von auxotrophen klinischen *P. aeruginosa*-Isolaten über Nacht bei 37 °C unter schütteln inkubiert. Von der bei -80 °C gelagerten *P. aeruginosa* Cosmid-Genbank, die sich in *E. coli* S17 befindet, wurden 10 ml LB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin direkt aus der Glycerinkultur mit einer  $OD_{578} = 0,05$  angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer  $OD_{578}$  von 0,3 gezüchtet. Dann wurden 500 µl dieser Kultur mit 500 µl stationärer *P. aeruginosa* Kultur gemischt und für eine Minute bei 13000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 50 µl LB-Medium aufgenommen, auf eine Agar-Platte getropft, unter der Sterilwerkbank getrocknet und für sechs Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einer Impföse von der Agar-Platte abgekratzt, in 500 µl PBS-Puffer resuspendiert und auf AB-Agar mit 100 µg/ml Tetracyclin ausplattiert. Gewachsene prototrophe Klone wurden isoliert, die Cosmide gewonnen (siehe Abschnitt 2.5.10) und *E. coli* DH10B damit transformiert (siehe Abschnitt 2.5.8) um höhere Plasmid-Konzentrationen isolieren zu können. Die *E. coli*-Zellen wurden auf LB-Agar mit Tetracyclin ausplattiert. Von positiven Klonen wurde 20 ml LB-Medium mit Tetracyclin angeimpft und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine Plasmid-Präparation (Abschnitt 2.5.10) dieser Kultur durchgeführt und die DNA in 30 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Davon wurden 10 µl einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *HindIII* unterzogen um das Insert aus dem Vektor pLAFR3 zu schneiden.

Nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese wurden die Restriktionsschnittmuster verglichen, das Insert interessanter Plasmide ansequenziert (Abschnitt 2.5.4) und die Se-

quenz mit der Datenbank im Internet abgeglichen (Winsor *et al.*, 2009) um das Gen zu identifizieren, was für die Auxotrophie verantwortlich ist.

#### 2.5.14 Gezielte Komplementation eines Gens

Um zu beweisen, dass die Methioninauxotrophie von klinischen CF-Isolaten durch eine Mutation im *metF*-Gen ausgelöst wird, wurde das Gen in den pUCP20T Vektor kloniert und nach der erfolgreichen Transformation von *E. coli* ST18 mittels diparentalem Mating in die klinischen Isolate eingebracht. Eine erfolgreiche Komplementation kann durch Wachstum auf AB-Minimalmedium nachgewiesen werden.

Zunächst wurde mittels PCR das 872 bp große *metF*-Gen aus dem *P. aeruginosa*-Genom amplifiziert, dabei mit entsprechenden Schnittstellen für Restriktionsenzyme versehen und in den pUCP20T-Vektor kloniert. Die verwendeten Primer sind in Tab. 5 zu finden. Der Vorteil des pUCP20T-Vektors ist ein Polylinker, der in der  $\alpha$ -Untereinheit des *lacZ*-Gens liegt. Findet eine Insertion in den Vektor statt, kann dies durch eine weiße Färbung der Kolonien beim Wachstum auf 40  $\mu\text{g/ml}$  X-Gal festgestellt werden. Eine intakte  $\alpha$ -Untereinheit ermöglicht die Synthese des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase. Diese wandelt X-Gal in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4-Dichloro-Indigo um, der sichtbar in den Zellen akkumuliert. Zellen mit gewünschtem Insert fehlt diese blaue Farbe und sie können leicht identifiziert werden. Positive Klone wurden isoliert (2.5.10), mittels Restriktionsanalyse überprüft und über diparentales Mating (2.5.9) in *P. aeruginosa* eingebracht. Eine erfolgreiche Komplementation konnte durch Wachstum auf Minimalmedium mit Carbenicillin gezeigt werden.

### 2.6 Transkriptomanalysen mittels *P. aeruginosa* GeneChips<sup>®</sup>

DNA-Mikroarrays haben sich in den letzten Jahren zu einer wichtigen Methode für die Analyse des Transkriptoms entwickelt. Mit ihnen ist es möglich, Veränderungen in der Expressionsstärke von bestimmten Genen des Organismus zu ermitteln, wenn diese bei verschiedenen Wachstumsbedingungen variieren. Um eine Analyse mit GeneChips<sup>®</sup> durchzuführen, wird zunächst die mRNA der Zellen, deren Expressionszustände miteinander verglichen werden sollen, isoliert und in cDNA umgeschrieben. Es folgt eine Markierung der cDNA, die anschließend auf die Chips gegeben werden kann. Dort findet eine Hybridisierung mit den sich auf dem Chip befindenden Sonden statt.

Für die Transkriptomanalysen wurden *P. aeruginosa* GeneChips<sup>®</sup> verwendet. Diese enthalten Sonden gegen 5549 der 5570 proteinkodierenden Gene, einem der vier rRNA-Operons



(23S, 16S, 5S rRNA), 18 der 63 tRNA Gene sowie gegen 199 ausgewählte intergenische Regionen des komplett sequenzierten und annotierten Genoms von *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000). Aufgrund von Genduplikationen im *P. aeruginosa*-Chromosom sind gegen 21 offene Leseraster keine Sonden auf dem Chip zu finden.

Weiterhin auf dem GeneChip® enthalten sind Sonden gegen 117 proteinkodierende Gene weiterer *P. aeruginosa*-Stämme sowie gegen 14 Gene von *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana*, wobei letztere als Kontrollen dienen.

Die auf dem GeneChip® enthaltenen Gen-Sequenzen entstammen der Sequenz-Datenbank GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und sind mit weiteren Informationen zum Aufbau des Chips in der Datenbank NETAFFX unter <http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx> einsehbar.

Für die Transkriptomanalyse sind auf dem GeneChip® eine variierende Anzahl an 25-mer Oligonukleotid-Sonden entsprechend der Länge der proteinkodierenden Gene (8-13), tRNA-Gene (8-16) und intergenischen Bereiche (13-122) immobilisiert worden (Lipshutz *et al.*, 1999). Jedes Oligonukleotid wird als Sondenzone (probe cell) mit Hilfe einer speziellen photolithographischen Technik auf einer Fläche von 20 µm × 20 µm *in situ* synthetisiert (Fodor *et al.*, 1991). Hierbei wird neben dem Oligonukleotid, das dem zu analysierenden Sequenzabschnitt komplementär ist (perfect match oligo, PM), ein Oligonukleotid mit einer eingefügten Fehlpaarung an Position 13 (mismatch oligo, MM) synthetisiert. Beide zusammen bilden ein Sondenpaar (probe pair). Die Signalintensität des MM gibt den Hintergrund der spezifischen Hybridisierung an, deren Wert im Laufe der *in silico* Hybridisierungs-Analyse von der Signalintensität des PM abgezogen wird. Alle Sondenpaare, die zusammen einen Sequenzabschnitt auf dem GeneChip® repräsentieren, werden als Sondenset (probe set) bezeichnet. Die Verteilung der Sondenpaare eines Sondensets auf dem 1,28 cm × 1,28 cm großen GeneChip® erfolgt statistisch, um die Auswirkungen von uneinheitlichem Hybridisieren und Färben oder mechanischen Schädigungen, wie z. B. Kratzer, auf die Datenerhebung zu minimieren.

### 2.6.1 Lösungen und Puffer

Killing-Puffer:	20 mM Tris
	5 mM MgCl <sub>2</sub>
	20 mM NaN <sub>3</sub>
	vor Zugabe des NaN <sub>3</sub> auf pH 7,5 einstellen

## MATERIAL UND METHODEN

Saccharose-Lösung:	300 mM Saccharose 10 mM Na-Acetat, pH 4,5
SDS-Lösung:	2 % (w/v) SDS 10 mM Na-Acetat, pH 4,5
Storage Puffer:	20 mM Na-Phosphat, pH 6,5 1 mM EDTA
10× DNase Puffer:	200 mM Na-Acetat, pH 4,5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM NaCl
Natriumacetat-Lösung:	3 M Na-Acetat, pH 4,5
10× MOPS-Puffer:	200 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA 5 g NaOH auf pH 7,0 einstellen
RNA-Probenpuffer:	6,5 ml Formamid 1,2 ml Formaldehyd 2 ml 10× MOPS-Puffer 0,4 ml 50 %ige Saccharose Bromphenolblau
10× TBE-Puffer:	20 mM EDTA 890 mM Tris 890 mM Borsäure pH 8,3

### 2.6.2 Präparation der RNA für die Transkriptomanalyse

Alle Behälter, Materialien und Lösungen, die bei den Arbeiten mit RNA verwendet worden sind, wurden zur Inaktivierung von RNasen zweimal autoklaviert. Außerdem wurde ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

Für die Ernte der Koloniebiofilme wurden 25 ml eiskalter Killing-Puffer in 50 ml Reaktionsgefäßen auf Eis vorgelegt. Sofort nach der Entnahme der Filter aus dem Anaerobenzelt wurden diese in je ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und der Biofilm schnellstmöglich durch Pipettieren resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension sofort zentrifugiert (4000 rpm, 10 min, 4 °C, Megafuge 1.0 R), der Überstand verworfen, das Bakteriensediment in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Aufbereitung bei -20 °C gelagert.

Nach kurzem Auftauen des Sediments wurde dieses in 125 µl eiskalter Saccharose-Lösung resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 125 µl SDS-Lösung wurde die Suspension gut gemischt und für 1 min bei 65 °C inkubiert. Das Gemisch wurde mit 400 µl heißem Phenol (65 °C) versetzt und für 3 min bei 65 °C inkubiert. Dabei wurde jede Probe minütlich kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren, für 10 min zentrifugiert (13000 rpm, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge), die obere Phase abgenommen und in ein neues Gefäß mit 400 µl heißem Phenol überführt. Danach wurde die Probe erneut für 3 min bei 65 °C inkubiert und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase mit 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion wurde einmal wiederholt und anschließend die obere Phase mit 400 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) vermischt. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 13000 rpm erfolgte die Fällung der RNA, indem die obere Phase in ein Gefäß mit 1 ml eiskaltem 100 %igem Ethanol und 40 µl Natriumacetat-Lösung überführt wurde und dieses über Nacht bei -20 °C gelagert wurde.

Am nächsten Tag wurde die RNA zentrifugiert (13000 rpm, RT, 10 min, Eppendorf Minispin), mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (13000 rpm, RT, 3 min), an der Luft getrocknet und für die weitere Behandlung in 180 µl RNA-Storage Puffer aufgenommen.

Um die RNA von DNA-Kontaminationen zu reinigen, wurden zu den 180 µl RNA in RNA-Storage Puffer weitere 20 µl 10× DNase Puffer zugegeben sowie 4 Units DNase I und diese Lösung für 30 min bei RT inkubiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

### 2.6.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte durch Bestimmung der Extinktion im UV-Bereich bei 260 und 280 nm mit dH<sub>2</sub>O als Referenz. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm wurde einer RNA-Konzentration von 40 µg/µl gleichgesetzt. Die Reinheit der RNA sollte nach einer 260/280-Messung bei mindestens 1,8 liegen, ein Quotient von 2,0 entspricht reiner RNA.

### 2.6.4 Elektrophoretische Auftrennung der RNA

Um die isolierte RNA auf eine mögliche Degradation zu überprüfen, wurden je 10 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt, mit 10 µl RNA-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels eines 1 %igen Agarosegels (w/v) mit 660 mM Formaldehyd im Laufpuffer (1× MOPS-Puffer) für 4 Stunden bei 100 V und 4 °C. Anschließend wurde das Gel für 20 min in 5 µg/ml Ethidiumbromid in MOPS-Puffer gefärbt und über Nacht bei 4 °C im Laufpuffer entfärbt.

Bei qualitativ geeigneter RNA werden bei Betrachtung des Gels unter UV-Licht zwei distinkte Banden sichtbar, die den 30S und 50S Untereinheiten der ribosomalen RNA entsprechen. Degradierter RNA würde als Schatten über den gesamten Auftrennungsbereich auftreten.

### 2.6.5 Aufbereitung der RNA für die GeneChip<sup>®</sup> Hybridisierung

Die Aufbereitung der RNA für die Hybridisierung der GeneChips<sup>®</sup> erfolgte nach Angaben des Herstellers. Aufgrund von möglichen Schwankungen in Bezug auf Zellzahl und physiologischen Zustand der Zellen während der Bakterienanzucht und der RNA-Präparation wurden pro Mikroarray RNA vier unabhängige Koloniebiofilme zu gleichen Mengen vereinigt. Alle nachfolgenden Schritte wurden in einem PCR-Cycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine Umschreibung der RNA in cDNA. Hierfür wurden pro Mikroarray 10 µg RNA mit 750 ng Random Primer versetzt und mit reinst. H<sub>2</sub>O auf 30 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde 10 min bei 70 °C in einem PCR-Cycler denaturiert und anschließend zum Anlagern der Primer 10 min bei 25 °C inkubiert. Für die cDNA-Synthese wurden dem Ansatz 30 µl cDNA Reaktions-Mix (12 µl 5× 1st Strand Buffer, 6 µl 100 mM DTT, je 10 mM dNTPs, 1500 U Reverse Transkriptase SuperScript, 30 U RNase Inhibitors

SUPERaseIn) zugegeben und 10 min bei 25 °C, anschließend 60 min bei 37 °C sowie weitere 60 min bei 42 °C inkubiert und zuletzt 10 min bei 70 °C denaturiert. Für die Degradation der RNA wurden 20 µl 1 M NaOH zugegeben und für 30 min bei 65 °C inkubiert. Nach Neutralisation mit 20 µl 1 M HCl wurde die cDNA mit Hilfe eines PCR-Reinigungskits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und durch Messung der UV-Absorption quantifiziert.

Die cDNA wurde anschließend mit DNase I verdaut, um Fragmente von 50 bp bis 200 bp Länge zu erhalten. Die Bestimmung der DNase I Konzentration für eine optimale Fragmentierung erfolgte durch Titration des Enzyms gegen die cDNA. Die cDNA wurde daraufhin mit 5 µl 10× One Phor-All Puffer (Amersham Pharmacia) und 0,7 Units DNase I pro µg cDNA versetzt, mit reinst. H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und 11 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Inaktivierung der DNase I bei 98 °C für 10 min. Die fragmentierte cDNA konnte bei -20 °C gelagert werden. Um die Fragmentierung zu überprüfen, wurden 5 µl des DNase-Verdaus auf ein 15 %iges TBE-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in 1× TBE bei 100 V für 90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längensstandard diente eine 100 bp DNA-Leiter (GeneRuler™, Fermentas). Das Gel wurde in 1× SYBR Gold (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) in reinst. H<sub>2</sub>O gefärbt und die fragmentierte cDNA unter UV-Licht detektiert.

Zur terminalen Markierung der cDNA-Fragmente mit Biotin-ddUTP wurde das BioArray Terminal Labeling Kit verwendet. Hierfür wurden 36 µl der fragmentierten cDNA mit 10 µl 5× Reaktionspuffer, 2 µl Biotin-ddUTP und 2 µl terminaler Desoxynukleotid-Transferase gemischt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt und die markierte cDNA bei -20 °C gelagert. Die Markierungseffizienz wurde mit Hilfe eines Neutravidin Gel-Shift Assays überprüft. Hierzu wurden 5 µl des Ansatzes mit der markierten cDNA mit 5 µl 0,4 % (w/v) Neutravidin (gelöst in 50 mM Tris) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden 5 µl der unmarkierten, aber fragmentierten cDNA mit Neutravidin versetzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 15 %igen TBE-Polyacrylamidgel und Färbung mit SYBR Gold wurde sowohl die Neutravidin-gebundene cDNA als auch die ungebundene cDNA (Kontrolle) unter UV-Licht detektiert.

### 2.6.6 Auswertungen der GeneChip® Hybridisierungen

Die Hybridisierung der GeneChips® mit der gelabelten cDNA sowie das Auslesen der Mikroarrays mit Hilfe des Affymetrix GeneArray Scanners wurde von Tanja Töpfer (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) durchgeführt.

Die Auswertung der Rohdaten mit der Software Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) erfolgte durch Maurice Scheer (Bioinformatik, AK Prof. D. Jahn). Die Expressionswerte wurden unter Nutzung einer Quantil-Normalisierung mit Hilfe der “Robust Multichip Average” (RMA) Methode ermittelt (Bolstad *et al.*, 2003; Irizarry *et al.*, 2003a; Irizarry *et al.*, 2003b). Neben der RMA-Methode wurden andere prozessierende Methoden wie „VSN“ (Huber *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2003) und „dChip“ (Li & Hung Wong, 2001; Li & Wong, 2001) angewandt, die vergleichbare Ergebnisse erzielten.

Die endgültige Auswertung erfolgte unter Verwendung von Excel-Tabellen, wobei für die tabellarische Darstellung der differentiell regulierten Gene die  $\log_2$  transformierten Signalintensitäts-Verhältnisse in lineare Signalintensitäts-Verhältnisse umgerechnet wurden.

## 2.7 Proteomanalyse mittels 2D Gelelektrophorese

In der Zwei-Dimensionalen (2D) Gelelektrophorese können komplexe Proteinmischungen über zwei Dimensionen aufgetrennt werden. Bei der ersten Dimension erfolgt die Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt der Proteine, in der zweiten Dimension erfolgt die Trennung nach der molekularen Masse. Somit können die Proteinmuster von Zellen aus verschiedenen Wachstumsbedingungen sehr gut miteinander verglichen werden. Die Methode wurde schon 1975 von O’Farrell und Klose unabhängig voneinander entdeckt, hat aber erst in den letzten 10 Jahren an Bedeutung gewonnen (Rehm, 2000). Zum einen ist die Reproduzierbarkeit der 2D Gele durch die Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten für die isoelektrische Fokussierung (IEF) stark verbessert worden. Zum anderen können Proteine durch die massenspektrometrische Analyse ihrer proteolytischen Spaltprodukte in Kombination mit den verfügbaren komplett sequenzierten Genomen und davon abgeleiteten Proteomen sehr schnell identifiziert werden. Durch den Vergleich der gebildeten Proteine unter verschiedenen Wachstumsbedingungen können Rückschlüsse auf die Funktion der Proteine und deren regulierte Synthese gezogen werden.

Während der IEF werden Proteine entsprechend ihrer Oberflächenladung voneinander getrennt. Die Trennung erfolgt über einen im Gel immobilisierten pH-Gradienten, der durch

Ampholyte aufrechterhalten wird. Ampholyte sind Moleküle mit mehreren positiven und negativen Ladungen, üblicherweise Polymere mit zahlreichen Amino- und Carboxylgruppen. Die Proteine behalten bei der Fokussierung ihre Eigenladung. Die kommerziell erhältlichen IEF-Streifen werden in Probenlösung und Probenpuffer (bestehend aus 3 - 8 M Harnstoff, gepufferten Detergenz CHAPS und dem reduzierenden Agens DTT) rehydriert. In der zweiten Dimension, der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), werden die Proteine nach ihrer denaturierten relativen molekularen Masse aufgetrennt, wobei ihre Eigenladung durch SDS-Behandlung maskiert wird. Noch vorhandene Disulfidbrücken werden durch DTT reduziert und mit Iodacetamid alkylisiert.

Nach der zweiten Dimension können die Proteine für die Dokumentation und Auswertung mit verschiedenen Methoden gefärbt werden. Eine Identifizierung der Proteine erfolgt über die Massenspektrometrie (z. B. MALDI-TOF). Dazu werden die Proteine aus dem Gel ausgestochen und tryptisch verdaut. Trypsin spaltet die Proteine in definierte Polypeptidfragmente. Die molekulare Masse der Polypeptidfragmente eines Proteins kann in der Massenspektrometrie analysiert werden. Die beim tryptischen Verdau eines Proteins entstehenden Peptide sind einmalig für jedes existierende Protein. Da Trypsin an definierte Aminosäuresequenzen die Polypeptidkette spaltet, ist bei Kenntnis der Aminosäuresequenz eines Proteins eine Vorhersage der entstehenden Spaltprodukte möglich. Dies ist auch für alle von Genen abgeleiteten Proteine eines Genoms möglich. Über einen computergestützten Vergleich von experimentell gewonnenen Peptiden mit den berechneten kann das zugehörige Protein identifiziert werden.

### 2.7.1 Lösungen

Kalium-Phosphat-Puffer:	siehe Abschnitt 2.1.3
BSA-Stammlösung:	5 mg/ml BSA (Albumin Fraktion V, Protease frei) in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer
Färbelösung BCA-Test (Sigma):	50 Teile A (Bicinchoninic acid solution) 1 Teil B (Copper (II) sulfate)

## MATERIAL UND METHODEN

Rehydratisierungslösung A:	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % CHAPS 50 mM DTT in reinst. H <sub>2</sub> O lösen und bei -80 °C lagern
Rehydratisierungslösung B:	2,5 ml Rehydratisierungslösung a 125 µl Ampholytlösung (für pH 5 - 8) 125 µl Triton X 100 1 Spatelspitze Bromphenolblau bei -80 °C lagern.
SDS-Elektrophoreselösung (10×):	30,25 g Tris 144 g Glycine 10 g SDS in 1 l reinst. H <sub>2</sub> O lösen
SDS-Equilibrierungspuffer:	6,7 ml TrisHCl (1,5 M, pH 8,8) 72 g Harnstoff 4 g SDS 69 ml / 87 g Glycerol 1 Spatelspitze Bromphenolblau auf 200 ml mit reinst. H <sub>2</sub> O auffüllen, Lagerung bei -20 °C
Displacing-Lösung:	25 ml TrisHCl (1.5 M, pH 8.8) 50 ml / 63 g Glycerol 25 ml reinst. H <sub>2</sub> O 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Sealing-Lösung:	25 ml SDS-Elektrophoresepuffer 125 mg Agarose 1 Spatelspitze Bromphenolblau Agarose in der Mikrowelle durch Erhitzen lösen



Fixierlösung:	300 ml Ethanol (techn.) 100 ml Essigsäure (95 - 99 %, techn.) 600 ml dH <sub>2</sub> O
RuBPS-Färbelösung:	300 ml Ethanol (techn.) 100 ml Essigsäure (95 - 99 %, techn.) 600 ml dH <sub>2</sub> O 40 µl RuBPS-Stammlösung
Waschlösung:	0,5 % Ameisensäure 5 % Methanol
Elutionslösung:	0,5 % Ameisensäure 65 % Methanol

RuBPS-Stammlösung wurde von Nelli Bös hergestellt.

### 2.7.2 Anzucht der Zellen

Um zufällige oder durch experimentelle Fehler verursachte Schwankungen und Variationen des Proteinmusters von einer induzierten Änderung der Synthese eines Proteins zu unterscheiden, wurden jeweils drei unabhängige Koloniebiofilme parallel untersucht.

Aerobe Vorkulturen vom *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 wurden auf die entsprechende Zelldichte verdünnt (siehe Abschnitt 2.4.4). Diese Verdünnung wurden mit entsprechendem Volumen auf 90 mm Ø Membranfilter aufgetragen, die anschließend auf Agar-Platten platziert wurden. Die Inkubation erfolgte anaerob bei 37 °C auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat und ASM-Agar mit 130 µM Nitrit und 260 µM Nitrat bis zur entsprechenden Stationärphase.

### 2.7.3 Ernten der Zellen

Für die Zellernte wurden 25 ml Kalium-Phosphat-Puffer in 50 ml Reaktionsgefäßen auf Eis vorgelegt. Sofort nach der Entnahme der Biofilme aus dem Anaerobenzelt wurden diese in je ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und der Biofilm schnellstmöglich durch Pipetieren gelöst. Die Zellsuspensionen wurden bei 4000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 1 ml Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 5 min, Biofuge fresco). Nach einem zwei-

ten Waschschrift wurden die Zellen bei -80 °C gelagert. Zuvor wurden je 60 µl für die BCA-Proteinbestimmung entnommen.

#### 2.7.4 Proteinbestimmung mittels BCA-Test

Für die Proteinbestimmung mittels BCA-Test wurde zunächst eine BSA-Kalibriergerade erstellt (Tab. 7). Je 60 µl der Eichlösungen, der Proteinproben und des Kalium-Phosphat-Puffers wurden mit 300 µl reinst. H<sub>2</sub>O, 150 µl 2 M NaOH versetzt und für 1 h bei 70 °C inkubiert. Für den Test wurden je 50 µl der Proben mit 1 ml Färbelösung (siehe Abschnitt 2.7.1) versetzt, bei 65 °C für 15 min inkubiert und auf RT abgekühlt. Diese wurden bei 562 nm gegen die Pufferprobe vermessen. Die Proteinkonzentration der Proben konnte mit Hilfe der Eichgeraden bestimmt werden. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tab. 7: Schema zur Erstellung der Eichlösungen für die Kalibriergerade des BCA-Proteintest.

Bezeichnung	Konzentration [µg/ml]	Proteinlösung [µl]	Puffer [µl]
A	5000	1000 Stock	0
B	4000	800 A	200
C	3000	375 B	125
D	2000	100 B	100
E	1000	100 D	100
F	500	100 E	100
G	250	100 F	100

#### 2.7.5 Zellaufschluss

Um die gewünschten Proteine zu isolieren wurden die geernteten und bei -80 °C gelagerten Zellen schnell aufgetaut und zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 5 min, Biofuge fresco). Das Bakteriensediment wurde in 400 µl eiskaltem Kalium-Phosphat-Puffer aufgenommen, zur Zelllyse mit 400 µl Phenol (equilibriert mit pH 7,4) versetzt und für 2 min intensiv geschüttelt. Danach erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 70 °C, dann eine 10-minütige Inkubation auf Eis und ein anschließender Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 4 °C, 5 min, Biofuge fresco). Dabei sammelten sich die Nukleinsäuren und Polysaccharide in der wässrigen Phase, die denaturierten Proteine befanden sich in der Grenzschicht. Die wässrige Phase wurde nach der Zentrifugation abgenommen und verworfen. Es folgten zwei Wasch-

schritte. Dazu wurden 400 µl reinst. H<sub>2</sub>O zu der Phenolphase gegeben und die oben beschriebenen Schritte zur Reinigung wiederholt.

### **2.7.6 Proteinfällung**

Zur Fällung der Proteine nach dem Zellaufschluss wurden 800 µl eiskaltes Aceton zur Phenolphase gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 1,2 ml Aceton resuspendiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Proteinsediment unter der Sterilwerkbank getrocknet und bei -80 °C gelagert.

### **2.7.7 Proteinbestimmung mit dem PlusOne 2D Quant Kit**

Mit Hilfe des BCA-Tests wurde die Menge an Rehydratisierungspuffer A bestimmt, in der die Proteine resuspendiert werden mussten. Dabei sollte eine Konzentration von 3 mg/ml eingestellt werden. Die Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut und in adäquater Menge Rehydratisierungspuffer A resuspendiert.

Die genaue Konzentration der Proteinproben wurde vor der IEF mit dem PlusOne 2D Quant Kit bestimmt. Dazu wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Von der Kalibriergeraden wurden jedoch nur die Werte für 0, 20 und 40 µg Protein verwendet. Die Proteinproben wurden für den Test im Verhältnis 1 zu 2 mit Rehydratisierungspuffer A verdünnt. Nach dem Test wurde die Konzentration der Proteinproben auf genau 2,5 mg/ml mit Rehydratisierungspuffer A eingestellt.

### **2.7.8 Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung**

Für die IEF wurden 500 µg Protein verwendet und nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Dazu wurden 200 µl der Proteinlösung (2,5 mg/ml) mit 100 µl Rehydratisierungspuffer B versetzt und in die entsprechende Quellschleife gefüllt. Anschließend wurde auf diese Lösung der pH-Gradientenstreifen (Ready Strip™ IPG Strips, 17 cm, pH 5 - 8, BioRad) aufgelegt. Dabei quoll das Gel am Streifen auf und die Proteine wurden in das Gel aufgenommen. Nach 1 h wurden die Streifen zum Schutz vor Verdunstung mit 3 ml Mineralöl überschichtet und über Nacht inkubiert.

### 2.7.9 Isoelektrische Fokussierung

Nach der Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden mit reinst. H<sub>2</sub>O befeuchtete Papierstücke (Elektrode Strip) für einen besseren Stromfluss über die Elektroden in der IEF-Kammer (BioRad) gelegt. Die pH-Gradientenstreifen wurden darauf gelegt und mit 3 ml Mineralöl überschichtet. Die IEF wurde nach dem in Tab. 8 beschriebenen Programm bei 20 °C und 50 µA pro Gel durchgeführt. Nach der IEF wurden die Streifen direkt für die SDS-PAGE verwendet oder bis zur Verwendung in einer Kunststoffhülle bei -80 °C gelagert.

Tab. 8: Spannungsverlauf während der isoelektrischen Fokussierung der Proteine.

Schritt	Spannung	Zeit	Übergang
1	250 V	1 h	rapid
2	500 V	1 h	rapid
3	1000 V	1 h	rapid
4	5000 V	22 h	rapid
5	500 V	99 h	rapid

### 2.7.10 Vorbereitung der pH-Gradientenstreifen für die SDS-PAGE

Die pH-Gradientenstreifen wurden zunächst in je 5 ml Equilibrierungspuffer mit 15 mM DTT leicht schüttelnd für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte zweimalig eine 15-minütige Inkubation in Equilibrierungspuffer mit 150 mM Iodacetamid.

### 2.7.11 Herstellung der Gele für die SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse wurden ca. 20 cm × 30 cm große SDS-Gele in einer speziellen Apparatur vorbereitet. Es konnten 14 Gele gleichzeitig in der Gelgießapparatur gegossen werden. Dazu wurde die Apparatur von unten mit der vorbereiteten Gellösung bis oben gefüllt. Anschließend wurden etwa 200 ml Displacing-Lösung zugegeben, um eine Polymerisation im Gießschlauch zu verhindern. Die Kämme wurden zwischen die Gelplatten gesteckt, die Apparatur mit Folie abgedeckt, die Gele für mindestens 2 h polymerisiert und konnten danach verwendet werden. Das Pipettierschema ist Tab. 9 zu entnehmen.

Tab. 9: Pipetierschema für die Herstellung der SDS-Gele.

Lösungen	Konzentration der Stammlösung	Volumen	Hinweis
Acrylamid-Stocklösung	30 %	400 ml	
TrisHCl (pH 8,8)	1,5 M	300 ml	
reinst. H <sub>2</sub> O		480 ml	mischen
SDS	10 %	12 ml	
APS	10 %	3 ml	Zugabe, 1 min
TEMED	10 %	1 ml	rühren, sofort gießen

(9 - 16 % Gradientengele: Mr = 8000 - 200 000)

### 2.7.12 SDS-PAGE

Die pH-Gradientenstreifen, in denen die fixierten und nach dem isoelektrischen Punkt aufgetrennten Proteine vorlagen, wurden luftblasenfrei auf die Geloberkante des SDS-Gels gelegt und mit Sealing-Lösung fixiert. Die Gele wurden in eine SDS-Laufkammer (Ettan-Dalt-12; Amersham Pharmacia) gesteckt und bei 20 °C und 1 Watt pro Gel so lange laufen gelassen, bis sich der blaue Bromphenolstreifen ca. 1cm über der unteren Gelkante befand. Die Gele wurden anschließend aus der Laufkammer entfernt und mit Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthroline disulfonate) (RuBPS) gefärbt.

### 2.7.13 Fluoreszenzfärbung mit RuBPS

Die Gele wurden nach den folgenden Angaben gefärbt. Die angegebenen Volumen gelten dabei für 2 Gele in einer Wanne:

Vorfixierung:	ca. 2 h	250 ml Fixierlösung
Fixierung:	über Nacht	500 ml Fixierlösung
Nachfixierung:	1 - 2 h	250 ml Fixierlösung
Färben:	3 - 6 h	500 ml RuBPS-Staining Lösung
Waschen:	10 min	500 ml dH <sub>2</sub> O

Die Gele wurden im FX-Scanner (BioRad) mit folgenden Einstellungen gescannt:

Protein Stain Sypro Ruby; Medium Intensity; 100 µM Auflösung

### 2.7.14 Auswertung der 2D Gele

Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe des Programms Delta2D von DECODON (DECODON GmbH, Greifswald, Deutschland). Zunächst wurden alle drei Gele, die von einem Zustand aber unterschiedlichen Proben angefertigt wurden, miteinander verglichen um zu klären ob die Migration der Proteine in den Gelen des gleichen Zustands miteinander korrelierte oder ob es starke Abweichungen gab. Wenn sich keine Abweichungen im Proteinmuster zeigten, wurde das Gel mit der besten Auftrennung ausgewählt und mit Hilfe des Programms mit dem zweiten zu untersuchenden Zustand verglichen. Proteinflecken, die mindestens um den Faktor 2 vermehrt in einem Zustand vorhanden waren oder zu denen sich in einem Zustand kein Äquivalent finden ließ, wurden ausgewählt und unter UV-Licht für die MALDI-TOF-Analyse ausgestochen.

### 2.7.15 Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse der Proteine wurde die MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight)-Methode angewendet.

Bei der MALDI-TOF werden die im Gel verdauten Proteine und die anschließend eluierten Polypeptidfragmente in einer Matrix UV-absorbierender Moleküle eingebaut. Diese übertragen Protonen auf die Peptide und laden sie positiv auf. Die Proteine werden in das Hochvakuum des Massenspektrometers geschoben und mit einem UV-Laser Puls ionisiert. Dieser setzt explosionsartig die UV-absorbierenden Moleküle und die darin enthaltenen Proteinionen frei. Die Proteine gehen auf diese Weise ohne Hydratwasser und Gegenionen, wie  $\text{Na}^+$  oder  $\text{Cl}^-$ , in die Gasphase über. Die Ionen werden durch ein elektrisches Feld auf eine Blende zu beschleunigt, wobei das Feld alle Ionen auf das gleiche Energieniveau beschleunigt und dadurch die Geschwindigkeit proportional zur Wurzel aus Ladung durch Masse ist. Dies gilt für dieses Messverfahren als Näherung, da die gemessenen Geschwindigkeiten kleiner als die Lichtgeschwindigkeit sind. Zwei Proteine mit gleicher Ladung aber unterschiedlicher Masse fliegen daher verschieden schnell. Die beschleunigten Ionen fliegen durch die Blende in eine feldfreie Vakuumflugröhre, in welcher sich ein Flugzeitanalysator befindet, der so genannte TOF (time of flight). Da alle Ionen die gleiche Strecke abfliegen (die Länge des TOF) und erst dann auf den Detektor treffen, sind die Flugzeiten abhängig vom Verhältnis aus Masse und Ladung, das durch die Messung der Zeit berechnet werden kann. Die MALDI-TOF bestimmt die Masse eines Polypeptidfragmentes mit einer Genauigkeit von 0,1 %. Mit Hilfe der Masse-Ladungsverhältnisse kann die entspre-

chende Größe der Fragmente bestimmt werden. Jedes Protein hat charakteristische Schnittstellen für Trypsin und damit eine charakteristische Zusammensetzung an Polypeptidfragmenten. Durch die bekannten Genomsequenzen kann mit einem *in silico* Trypsinverdau die Fragmentzusammensetzung eines Proteins bestimmt werden. Durch Vergleich der analysierten Fragmente mit den theoretisch vorhandenen können die Proteine identifiziert werden (Rehm, 2000).

### 2.7.16 Vorbereitung der Proben für die MALDI-TOF-Analyse

Die aus der Gelmatrix ausgestochenen Proteine wurden zunächst 5 min in 200 µl reinst. H<sub>2</sub>O gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und die Gelstücke mit 20 µl Acetonitril überschichtet und 15 min bei RT inkubiert. Dabei wurde dem Gel das Wasser entzogen. Der Überstand wurde entfernt und die Gelstücke im Vakuumkonzentrator unter Vakuum getrocknet.

Für den folgenden tryptischen Verdau wurden die Gelstücke in 10 µl Trypsinlösung (2 ng/µl) rehydriert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Extraktion der Peptide aus dem Gel wurden zunächst 15 µl 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> zugegeben und für 15 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Acetonitril, folgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 37 °C. Der Überstand wurde entfernt und in einem neuen Gefäß gesammelt. Zu den Gelstücken wurden 45 µl 5 %ige Ameisensäure gegeben und die Proben für 15 min bei 37 °C geschüttelt. Es wurden 45 µl Acetonitril hinzu gegeben und nochmals 15 min inkubiert. Die Überstände wurden anschließend abgenommen und vereinigt, im Vakuumkonzentrator möglichst weit eingengt und bei -20 °C gelagert.

Vor der MALDI-TOF-Analyse wurden die Peptide auf einen metallischen Träger aufgetragen. Die Peptide wurden dazu in 15 µl Waschlösung durch kurze Inkubation im Ultraschallbad gelöst. Die ZipTip® C18 wurden zunächst mit Elutionslösung gewaschen und mit Waschlösung equilibriert. Anschließend wurden die Peptide mit dem ZipTip® ca. 10 Mal aufgezogen. Das ZipTip® wurde dann 2 bis 3 Mal in Waschlösung gewaschen und die Peptide in 5 µl Elutionslösung eluiert. Anschließend wurde 1 µl peptidhaltige Elutionslösung direkt auf dem Träger mit 1 µl Matrixlösung vermischt. Nach Trocknung der Proben konnte der Träger für die MALDI-TOF-Analyse eingesetzt werden.

Die Proben wurden in einem MALDI-TOF von Dr. Lothar Jänsch am HZI (Braunschweig) vermessen.

## 2.8 Metabolomanalyse mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Der Begriff Metabolom fasst alle charakteristischen Stoffwechseleigenschaften einer Zelle zusammen. Dazu gehören die Gesamtheit der Stoffwechselprodukte einer Zelle, die Enzymaktivitäten und die Interaktionen zwischen den verschiedenen Stoffwechselwegen.

Die Vermessung der Metabolite erfolgte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Dabei dienen der Gaschromatograph der Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches und die Massenspektrometrie der Identifizierung der so erhaltenen einzelnen Substanzen. Bei der Massenspektrometrie werden die Substanzen zunächst ionisiert, wobei sie durch den Beschuss mit Elektronen in charakteristische Fragmente zerlegt werden, die abhängig von der Struktur der einzelnen Moleküle sind. Im Analysator werden die Ionen voneinander getrennt und auf einen Detektor hin beschleunigt, wobei jedes einzelne Fragment in Abhängigkeit seiner Masse zu einem charakteristischen Zeitpunkt auf den Detektor trifft. Die Retentionszeit (Zeit zwischen Probenaufgabe und Detektion der Einzelsubstanz) ist dann der Parameter, der Aufschluss über die Identität der Substanz gibt. Die GC-MS ist eine sehr empfindliche Analysenmethode, mit deren Hilfe sich Substanzmengen unterhalb von 0,1 ng nachweisen lassen.

Die Metabolomanalysen wurden von dem Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1 während der Inkubation auf unterschiedlichen Medien durchgeführt. Dazu wurden Koloniebiofilme unter anaeroben Bedingungen bis in die Stationärphase inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Metabolite.

### 2.8.1 Kultivierung der Zellen

Um Metabolit-Konzentrationen von Bakterien während des Biofilmwachstums auf unterschiedlichen Medien zu untersuchen, wurden für eine Messung 150 mg Feuchtmasse benötigt. Dazu wurden PVDF Filter (90 mm Ø) mit PAO1 beimpft (siehe 2.4.4) und anaerob auf LB-Agar mit 50 mM KNO<sub>3</sub> oder ASM-Agar mit 130 µM NaNO<sub>2</sub> und 260 µM KNO<sub>3</sub> bis zur Stationärphase inkubiert. Um Konzentrationsunterschiede von Metaboliten statistisch absichern zu können, wurden pro Wachstumsbedingung drei unterschiedliche Koloniebiofilme untersucht.



### 2.8.2 Zellernte

In 50 ml fassenden Reaktionsgefäßen wurden 10 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung auf Eis vorgelegt. Sofort nach der Entnahme der Filter aus dem Anaerobenzelt wurden diese in je ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und der Biofilm schnellstmöglich durch Pipettieren gelöst. Die Zellsuspensionen wurden bei 4000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 2 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung resuspendiert, in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 5 min, Biofuge fresco). Die Feuchtmasse wurde bestimmt und 150 mg wurden in 1,5 ml Methanol mit 0,2 mg/ml Ribitol aufgenommen. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C eingefroren.

### 2.8.3 Zellaufschluss und Vorbereitung für die Derivatisierung

Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges Auftauen und Einfrieren der Zellen in der Methanol-Ribitol-Lösung bei -80 °C. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in 15 ml Reaktionsgefäße überführt, mit 1,5 ml Wasser versetzt, intensiv geschüttelt und auf zwei 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nun erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 10000 rpm und 20 °C. Der Überstand wurde in ein Glasgefäß überführt, mit 1,5 ml Chloroform (zur Analyse) versetzt und erneut intensiv geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 2000 rpm, 20 °C) wurde die obere Phase mit den polaren Stoffen (gelöst in Methanol/Ribitol/Wasser) abgenommen und mittels SpeedVac eingetrocknet.

Die getrockneten Proben konnten nun bei -20 °C gelagert werden, bevor sie derivatisiert und vermessen wurden. Dazu mussten die Lagerungsgefäße mittels Parafilm luftdicht abgeschlossen werden, um eine Verflüchtigung der Metabolite zu vermeiden.

### 2.8.4 Derivatisierung und Vermessung der Proben

Zur Derivatisierung der eingetrockneten Proben wurden je 50 µl Methoxyamin (in Pyridin, mit einer Konzentration von 20 mg/ml) zugefügt, kurz intensiv geschüttelt und für 90 min bei 200 rpm und 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 80 µl N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) zugegeben, erneut intensiv geschüttelt und für weitere 30 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bevor die Probe bei RT für weitere 2 h inkubiert wurde. Schließlich wurden 6 µl Alkanmix hinzu gegeben und die Probe 5 min bei 13400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in Glasvials überführt.

Anschließend konnten die Proben mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) vermessen werden. Dieses wurde in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. D. Schomburg (Institut für Bioinformatik und Biochemie der TU Braunschweig) durchgeführt.

Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm XCalibur ausgewertet und anschließend in der Systomonas-Datenbank ([www.systomonas.de](http://www.systomonas.de)) abgelegt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

*P. aeruginosa* ist an 80 % aller CF-assoziierten Lungeninfektionen beteiligt, wobei dessen hohe Antibiotikaresistenz *in vivo* es unmöglich macht den Keim abzutöten und damit maßgeblich für den Tod der Patienten verantwortlich ist (Campodonico *et al.*, 2008; Ratjen & Döring, 2003). Entsprechende Antibiotikaresistenzen sind *in vitro* während des Wachstums in Standardmedien nicht mehr zu beobachten.

Daher ist es von großem Interesse das Milieu einer CF-Lunge in einem *in vitro* Modell zu simulieren um die Einflüsse, die zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Antibiotika führen, identifizieren zu können und so eine bessere Therapie zu ermöglichen. Zwar sind seit längerem Sauerstoffmangel und geringe Nitrat-Konzentrationen als charakteristische Parameter der CF-Lunge bekannt, trotzdem wurde der Einfluss insbesondere der physiologischen Nitratkonzentrationen auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* bis jetzt nicht untersucht.

#### 3.1 Wachstumsverhalten in ASM

Zur Simulation von CF-Respirationstraktbedingungen wurde in dieser Arbeit ein artifizielles Sputum Medium (ASM) in Anlehnung an Sriramulu *et al.* (2005) verwendet. Dieses Medium enthält viele Bestandteile in Konzentrationen, die durchschnittlich im Sputum von CF-Patienten bestimmt wurden, wie Salzionen, DNA, Muzine, Aminosäuren und Lecithin. Durch den Einsatz des Chelators DTPA wird Eisenmangel erzeugt, der ebenso charakteristisch für das Respirationstraktmilieu ist, wie zuvor genannte Bestandteile (Ghani & Soothill, 1997). Da der pH-Wert der CF-Lunge mit 6,5 beschrieben wurde (Coakley *et al.*, 2003; Platt *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2006), ist der pH-Wert des Mediums für die Untersuchungen dieser Arbeit angepasst worden. Das Medium wurde immer frisch hergestellt und anschließend bei 4 °C gelagert, da im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass es andernfalls zur Aggregation von Medienbestandteilen kommt und sich keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen lassen.

##### 3.1.1 Wachstum im Flüssigmedium

Um das Wachstumsverhalten von *P. aeruginosa* in ASM zu überprüfen, wurde der Wildtyp PAO1 unter aeroben Bedingungen in flüssigem ASM inkubiert. Als Referenzmedium wurde LB-Medium verwendet. Das bewachsene Medium wurde nach 24-stündiger Inkubation 1000-fach vergrößert, aufgenommen und ist in Abb. 7 zusehen. Das ASM beinhaltet

an sich kleine Flocken, die unter dem Mikroskop sichtbar sind (Abb. 7A). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ungelöste Muzine. Während die Bakterien im LB-Medium planktonisch wachsen (Abb. 7B), lagern sich die Zellen in ASM in biofilmähnlichen Mikrokolonien (Abb. 7C+D) zusammen, die nicht an einer Oberfläche haften. Dies wurde zuvor auch von Sriramulu *et al.* (2005) für das Medium beschrieben und ist charakteristisch für das *P. aeruginosa*-Wachstum in der CF-Lunge (Lam *et al.*, 1980; Singh *et al.*, 2000; Worlitzsch *et al.*, 2002).

Da, wie mehrfach erwähnt, in der CF-Lunge auch ein anaerobes Milieu zu finden ist, wurde das Wachstum ebenfalls unter anaeroben Bedingungen untersucht. Den Flüssigmedien wurden 50 mM KNO<sub>3</sub> als alternativer Elektronenendakzeptor zugesetzt, um ein adäquates Wachstum beobachten zu können. Auch hier bildeten sich Mikrokolonien im ASM (Abb. 7F) im Gegensatz zum planktonischen Wachstum in LB (Abb. 7E). Diese Beobachtungen untermauern die Aussage, dass es sich bei ASM um ein adäquates Medium zur Simulation der CF-Lunge handelt (Sriramulu *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde die Konzentration der Aminosäuren an die durchschnittliche Aminosäureverteilung menschlicher Proteine angepasst um das Medium besser den Respirationstraktbedingungen des Menschen anzugleichen. Allerdings konnte kein Unterschied im Wachstumsphänotyp beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Aus Gründen der einfacheren Handhabung und Vergleichbarkeit wurden die von Sriramulu *et al.* (2005) veröffentlichten Aminosäurekonzentrationen beibehalten.

Allerdings weist das Medium in der experimentellen Anwendung auch Nachteile auf. Für Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalysen werden große Zellmengen benötigt. Allein für die Metabolomanalysen sind mindestens 500 mg Zellmasse notwendig. Diese Zelldichten werden gerade unter anaeroben Bedingungen bei Verwendung unterschiedlicher Nitrat-Konzentrationen in ASM nur sehr langsam erreicht. Dabei können die Mikrokolonien nicht in frisches Medium umgesetzt werden. Außerdem führen von *P. aeruginosa* metabolisierte und sekretierte Stoffe zu einer veränderten Zusammensetzung des Mediums, dessen pH-Wert trotz Pufferung auf einen Wert von 10 ansteigen kann. Somit ist ein reproduzierbares Wachstum über einen längeren Zeitraum in flüssigem ASM nicht zu erreichen. Auch ist es durch Einsatz von Detergenzien und/oder physikalische Einwirkung nicht möglich gewesen die Zellverbände von *P. aeruginosa* während der Inkubation in ASM zu lösen um die Zellzahl zu bestimmen.

Des Weiteren kann für Analysen des Transkriptoms, Proteoms und Metaboloms nicht die benötigte Reinheit der Zellen erzielt werden, da während der Zentrifugation auch Medienbestandteile sedimentiert werden, die in weiteren Waschschritten nicht eliminiert werden

können. Aus den oben genannten Gründen bietet sich das Wachstum in so genannten Koloniebiofilmen für diese Experimente an.

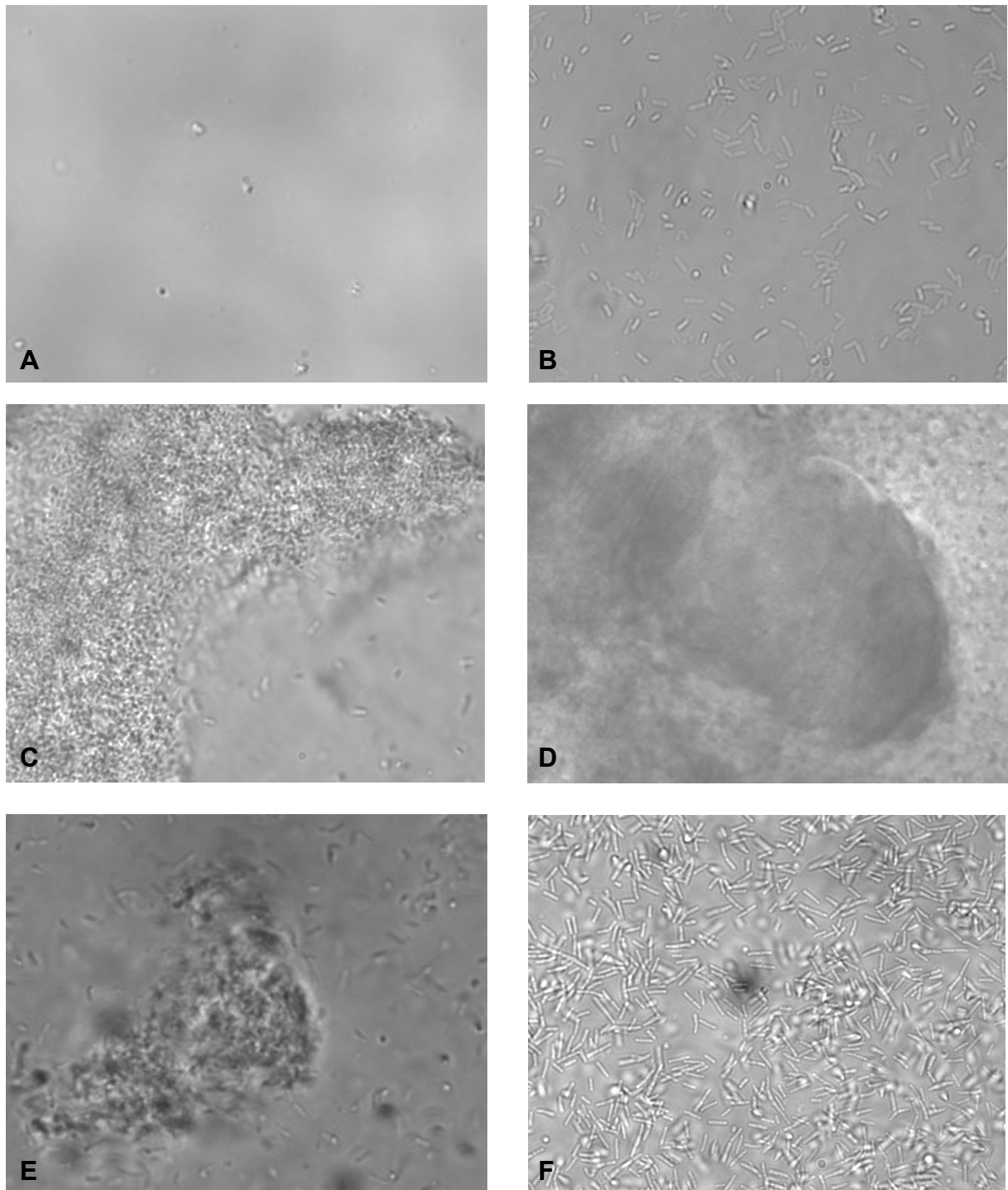


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahmen von verschiedenen, bewachsenen und unbewachsenen Nährmedien. ASM ohne Bakterien (A) bei 1000-facher Vergrößerung. *P. aeruginosa* PAO1 wurde für 24 h aerob inkubiert in LB- (B) und ASM-Flüssigmedium (C) bei 1000-facher Vergrößerung sowie bei 400-facher Vergrößerung in ASM-Flüssigmedium (D). *P. aeruginosa* PAO1 nach anaerober Inkubation für 24 h in ASM- (E) und LB-Flüssigmedium (F) jeweils mit 50 mM KNO<sub>3</sub> bei 1000-facher Vergrößerung.

### 3.1.2 Wachstum im Koloniebiofilm

Da Biofilme die bevorzugte Wachstumsform von *P. aeruginosa* während der Infektion sind, wurde zur einfachen Simulation und besseren Handhabung das Koloniebiofilmmodell gewählt. Dabei wachsen die Biofilme auf sterilen PVDF-Filtern mit einer Porengröße von  $0,22\ \mu\text{m}$ , die auf Agar-Platten des entsprechenden Mediums gelagert sind. Da *P. aeruginosa* bei Sauerstoffmangel unter CF-Respirationstraktbedingungen wächst, wurden Wachstumsexperimente unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde als Referenzmedium LB-Agar mit  $50\ \text{mM KNO}_3$  und ASM-Agar mit unterschiedlichen Nitrat-Konzentrationen verwendet. Die Koloniebiofilme wurden mit einer Zelldichte von ca.  $2 \times 10^4$  Zellen pro Filter beimpft (Abschnitt 2.4.4), bei  $37\ ^\circ\text{C}$  inkubiert und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.3).

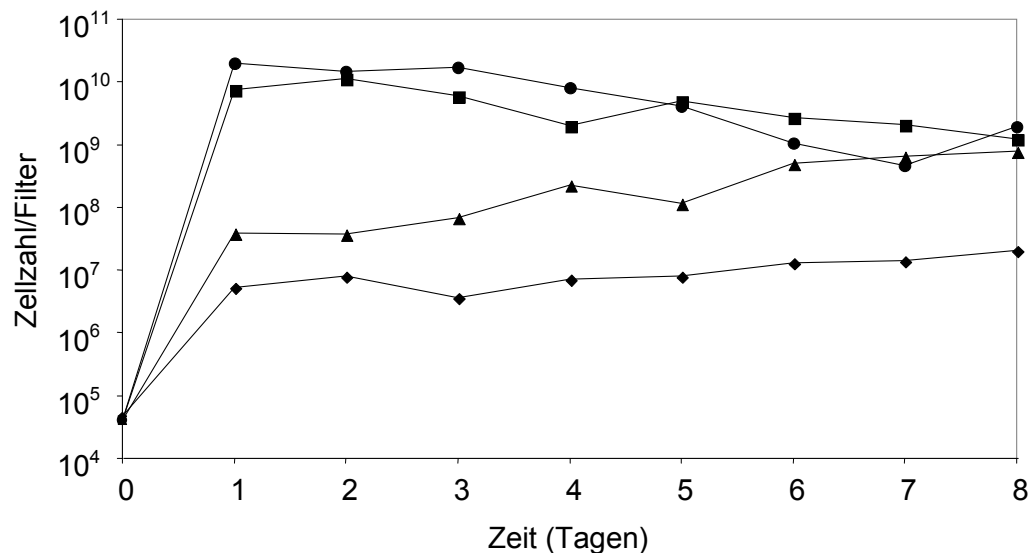


Abb. 8: Wachstumskurven von Koloniebiofilmen des *P. aeruginosa* Wildtyps PAO1 auf unterschiedlichen Medien. Viereck: LB-Agar mit  $50\ \text{mM KNO}_3$ , Kreis: ASM-Agar mit  $50\ \text{mM KNO}_3$ , Dreieck: ASM-Agar mit  $130\ \mu\text{M NaNO}_2$  und  $260\ \mu\text{M KNO}_3$ , Raute: ASM-Agar ohne Nitrat. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei  $37\ ^\circ\text{C}$ . Dargestellt ist die Zellzahl pro Filter über einen Zeitraum von 8 Tagen.

Werden die Zellen auf LB- und ASM-Agar mit  $50\ \text{mM}$  Nitrat inkubiert, erreichen sie bereits nach 24 h mit einer Zellzahl von ca.  $1 \times 10^{10}$  pro Filter die Stationärphase (Abb. 8). Im Gegensatz dazu wachsen Zellen deutlich langsamer, wenn sie mit geringen Konzentrationen von  $130\ \mu\text{M}$  Nitrit und  $260\ \mu\text{M}$  Nitrat inkubiert werden. Diese entsprechen in etwa den durchschnittlichen physiologischen Konzentrationen in der CF-Lunge (Grasemann *et al.*, 1998). Mit einer Generationszeit von ca. 32 h erreichen die Zellen erst nach sechs Tagen und einer Zellzahl von  $5 \times 10^8$  pro Filter die Stationärphase. Werden die Zellen ausschließlich auf ASM ohne Zusatz von Nitrat inkubiert, steigt die Zellzahl sehr langsam mit einer Generationszeit von 86 h und erreicht bis zum Ende des Experiments eine Zellzahl von

$2 \times 10^7$  pro Filter. Dieses relativ langsame Wachstum ist wahrscheinlich ausschließlich auf die Fermentation von Arginin zurückzuführen, während bei Zusatz von Nitrat und Nitrit zusätzlich eine Denitrifikation stattfinden kann, die ein schnelleres Wachstum und höhere Zellzahlen ermöglicht. Der etwas sprunghafte Anstieg der Zellzahl während der ersten 24 h könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass Sauerstoff oder Nitrat in den Filtern bzw. durch das, zur Verdünnung der Zellen verwendete Medium zum Wachstum beiträgt. Zum anderen könnten die Bakterien durch die vorangegangene Anzucht in LB-Medium in der Zelle gespeichertes Arginin zum Wachstum verwenden.

Langsames Wachstum ist charakteristisch für das Wachstum in der CF-Lunge und Untersuchungen von klinischen *P. aeruginosa*-Isolaten, die direkt aus dem Sputum von Patienten isoliert wurden, zeigten Generationszeiten zwischen 100 und 200 min (Yang *et al.*, 2008). Diese sind allerdings nicht direkt mit den vorliegenden Bedingungen vergleichbar, da bei den publizierten Ergebnissen auch aerobe Bedingungen vorlagen.

Durch die Verwendung der durchschnittlichen physiologischen Nitrat- und Nitrit-Konzentrationen von 260  $\mu\text{M}$  Nitrat und 130  $\mu\text{M}$  Nitrit wird ein weitaus langsames Wachstum mit einer Generationszeit von ca. 32 h erzielt. Unter Berücksichtigung des heterogenen Milieus in der CF-Lunge ließe sich diese Wachstumsgeschwindigkeit möglicherweise im Inneren einer anaeroben Nische beobachten, wenn Messungen unter diesen Bedingungen möglich wären.

Somit wurde zur besseren Simulation der CF-Respirationstraktbedingungen für weitere Experimente das Medium modifiziert indem die durchschnittlichen physiologischen Nitrat- und Nitrit-Konzentrationen von 260  $\mu\text{M}$  Nitrat und 130  $\mu\text{M}$  Nitrit verwendet wurden, die im Weiteren nur noch als physiologische  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen bezeichnet werden.

### 3.2 Energiegewinnung in ASM

In ASM, so zeigten Untersuchungen von Sriramulu *et al.* (2005), werden unter aeroben Bedingungen größtenteils Muzine als Energiequelle genutzt. Im Gegensatz dazu wurde für CF-Respirationstraktbedingungen beschrieben, dass ausreichende Mengen Nitrat und Nitrit vorliegen, welche *P. aeruginosa* in einem anaeroben Milieu als alternative Elektronenendakzeptoren dienen und dadurch Wachstum ermöglichen (Hassett *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde eine Energiegewinnung durch Metabolisierung von Aminosäuren gezeigt (Palmer *et al.*, 2005).

Fraglich ist, welche Prozesse in ASM mit physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen für die anaerobe Energiegewinnung wichtig sind und in wie weit Denitrifikations- und Fermentationsprozesse zum Wachstum beitragen. Dazu wurde das Wachstumsverhalten von Deletionsmutanten der cytoplasmatischen Nitrat-Reduktase *narGHJI* (PAO  $\Delta nar$ ), der periplasmatischen Nitrat-Reduktase *napABCDEFG* (PAO  $\Delta nap$ ), einer *narGHJI/napABDEFG* (PAO  $\Delta nar\Delta nap$ ) Doppelmutante und einer Mutante deren Argininfermentationsgene *arcDABC* deletiert wurde (PAO  $\Delta arcDABC$ ) im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp PAO1 unter anaeroben Bedingungen auf ASM-Agar mit physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen untersucht. Koloniebiofilme wurden wie unter Abschnitt 2.4.4 beschrieben beimpft und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.3). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C.

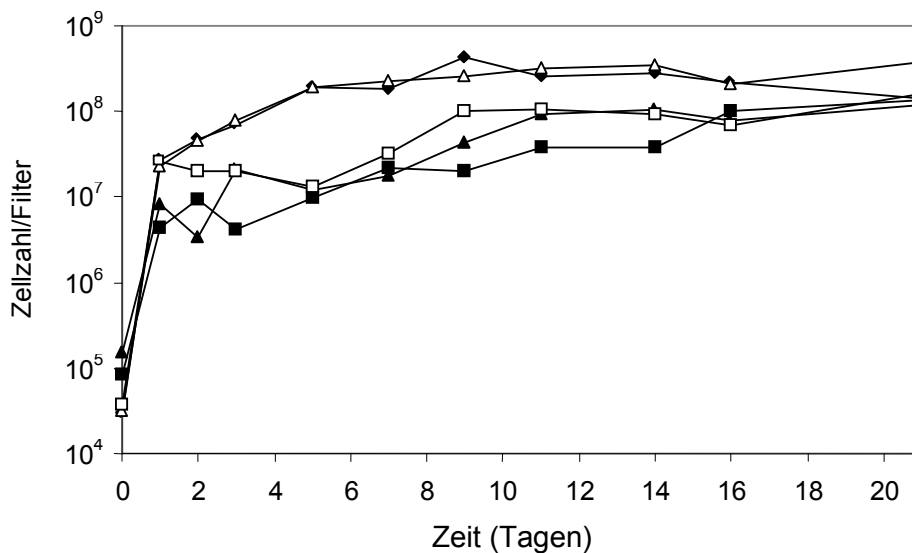


Abb. 9: Wachstumskurven von Koloniebiofilmen unterschiedlicher Deletionsmutanten und des korrespondierenden Wildtyps auf ASM-Agar mit physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen. Ausgefüllte Raute: *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1, ausgefülltes Quadrat:  $\Delta nar$ -Mutante, leeres Dreieck:  $\Delta nap$ -Mutante, ausgefülltes Dreieck:  $\Delta nar\Delta nap$ -Doppelmutante, leeres Quadrat:  $\Delta arcDABC$ -Mutante. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. Dargestellt ist die Zellzahl pro Filter über einen Zeitraum von 21 Tagen.

Wie in Abb. 9 zu sehen ist, zeigen alle Biofilme zu Beginn eine durchschnittliche Zellzahl von ca.  $5 \times 10^4$  Zellen pro Filter. Der Wildtyp PAO1 erreicht nach ca. sechs Tagen die Stationärphase ebenso wie die  $\Delta nap$ -Mutante, wobei schon nach 24 h eine Übergangsphase mit deutlich geringerem Wachstum zu beobachten ist. Die  $\Delta arcDABC$ -Mutante erreicht nach 24 h die gleiche Zellzahl von ca.  $3 \times 10^7$  pro Filter wie PAO1. Jedoch stagniert das Wachstum bis zum fünften Tag. Im Folgenden kommt es zu einer langsamen Zunahme der Zellzahl auf schließlich  $1 \times 10^8$  pro Filter nach 21 Tagen. Somit erreicht die  $\Delta arcDABC$ -Mutante zwar das gleiche Niveau wie PAO1 und die  $\Delta nap$ -Mutante, jedoch sorgt die feh-



lende Energiegewinnung durch die Argininfermentation für ein langsames Wachstum, was die Wachstumskurve eindeutig zeigt. Ein deutlich langsames Wachstum als der Wildtyp zeigen nach 24 h die  $\Delta nar$ -Mutante der cytoplasmatischen Nitrat-Reduktase und die  $\Delta nap\Delta nar$ -Doppelmutante, die beide nur ca.  $5 \times 10^6$  Zellen pro Filter erreichen. Wie anhand der Wachstumskurven zu sehen ist, steigt auch bei diesen Stämmen die Zellzahl im weiteren Verlauf langsam an, bis diese nach 21 Tagen das Niveau des Wildtyp PAO1, der  $\Delta arcDABC$ - und  $\Delta nap$ -Mutante erreichen. Der etwas sprunghafte Anstieg der Zellzahl während der ersten 24 h könnte auch hier auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein, die unter Abschnitt 3.1.2 bereits diskutiert wurden.

Diese Daten dokumentieren eindeutig, dass die periplasmatische Nitrat-Reduktase nicht an der Energiegewinnung in ASM beteiligt ist, da die  $\Delta nap$ -Mutante das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp PAO1 aufweist, wie die nahezu identischen Wachstumskurven beider Stämme zeigen. Es wurde eine Beteiligung der periplasmatischen Nitrat-Reduktase in der Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts, der Anpassung von aeroben zu anaeroben Bedingungen oder in der aeroben Denitrifikation postuliert (Philippot & Hojberg, 1999). Untersuchungen von Potter *et al.* (1999) zeigten, dass das Vorhandensein der periplasmatischen Nitrat-Reduktase bei *E. coli* einen Wachstumsvorteil unter nitratlimitierenden Bedingungen hat. Letztere kommen in Menschen vor, was zu der Vermutung führte, dass dieses Enzym während der Infektion eine entscheidende Rolle spielt. Diese These wurde durch das Vorhandensein hochkonservierter *nap*-Gene in einer Vielzahl von Pathogenen wie *Vibrio cholerae* und *Yersinia pestis* unterstützt (Potter *et al.*, 1999). Die hier gewonnen Ergebnisse zeigen, dass die periplasmatische Nitrat-Reduktase von *P. aeruginosa* während infektionsähnlicher und nitratlimitierender Bedingungen, wie in der CF-Lunge, keine essentielle Rolle spielt und stehen in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Untersuchungen mit verdünntem CF-Sputum (Palmer *et al.*, 2007b).

Der langsame Anstieg der Zellzahl im Vergleich zum Wildtyp der  $\Delta nar$ - bzw.  $\Delta nap\Delta nar$ -Mutante zeigt die wichtige Rolle der cytoplasmatischen Nitrat-Reduktase für das Wachstum unter diesen simulierten Respirationstraktbedingungen. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Palmer *et al.* (2007b), die die Wichtigkeit des Enzyms für das Wachstum in der CF-Lunge dokumentiert haben. Die Argininfermentation ist in ASM ebenso von Bedeutung, allerdings ist eine Deletion der *arcDABC*-Gene im Vergleich zur ausbleibenden Reduktion von Nitrat bei den  $\Delta nar$ - bzw.  $\Delta nap\Delta nar$ -Mutanten bei Betrachtung der Wachstumskurven eher zweitrangig, wobei die deutlich geringere Energiegewinnung durch die Argininfermentation berücksichtigt werden muss (Vander Wauven *et al.*, 1984). Zwar

zeigten Ergebnisse von Palmer *et al.* (2007b) keinen Wachstumsdefekt einer  $\Delta arcDABC$ -Mutante während der anaeroben Inkubation in verdünntem CF-Sputum, allerdings wurden für entsprechende Experimente 50 mM Nitrat verwendet. Die hier gewonnenen Ergebnisse belegen eindeutig, dass während der Inkubation mit physiologischen  $NO_x$ -Konzentrationen die Argininfermentation einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum hat.

Durch Verwendung einer  $\Delta nap \Delta nar \Delta arcDABC$ -Dreifachmutante hätte weiterhin untersucht werden können, ob das Bakterium Bestandteile des Mediums zur Energiegewinnung nutzen kann.

In ASM mit physiologischen  $NO_x$ -Konzentrationen wird ein Wachstum durch Argininfermentation und Nitratrespiration durch die cytoplasmatische Nitrat-Reduktase ermöglicht, was in Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Überlebensmöglichkeiten für CF-Respirationstraktbedingungen steht (Hassett *et al.*, 2002; Palmer *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2002). Darüber hinaus zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die Argininfermentation in diesem Modell einen erheblichen Anteil an der Energiegewinnung hat.

### 3.3 Wachstum von CF-Isolaten

Während des Wachstums von *P. aeruginosa* in der Lunge von CF-Patienten verändert sich der Geno- und Phänotyp zum Teil sehr deutlich (Mathee *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2006). Die Arbeit von Smith *et al.* (2006) konnte zeigen, dass während des Wachstums in der CF-Lunge verschiedene Mutationen auftreten können, die zu diversen Phänotypen führen. Dabei wurden häufig auxotrophe Stämme nachgewiesen, die besser an ihre Umgebung angepasst scheinen und dadurch ihr Überleben unter diesen Bedingungen gewährleisten. Um zu überprüfen, ob klinische Isolate auch in ASM Wachstumsvorteile durch ihre jahrelange Anpassung und mögliche Mutationen gegenüber dem Wildtyp haben, wurden unterschiedliche Isolate auf ihren Wachstumsphänotyp in ASM untersucht, die von der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt wurden. Dabei wurden insgesamt fünf Isolate überprüft, von denen je zwei (RN3 und RN46 bzw. BT2 und BT72) einem Patienten zugeordnet werden können. Die Isolate mit größerer Zahl wurden im späteren Verlauf der Infektion isoliert. Es wurden Koloniebiofilme wie unter Abschnitt 2.4.4 beschrieben beimpft und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.3). Die Inkubation erfolgte auf ASM-Agar mit physiologischen  $NO_x$ -Konzentrationen unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C.

Die Ergebnisse sind in Abb. 10 zu sehen. Es konnte für den Wildtyp PA14 während der ersten 72 h ein geringeres Wachstum im Vergleich zum Wildtyp PAO1 beobachtet werden. Nach 72 h wachsen beide Stämme mit gleicher Geschwindigkeit bis nach fünf Tagen PA14 mit einer Zellzahl von  $5,4 \times 10^8$  pro Filter die Stationärphase erreicht, während PAO1 lediglich zu einer Zelldichte von  $4,3 \times 10^8$  pro Filter wächst. Dieses Phänomen konnte bereits während zahlreicher Experimente in Flüssigmedium beobachtet werden, wobei PA14 nach 24-stündiger Inkubation ebenfalls eine geringere Zellzahl im Gegensatz zu PAO1 aufwies. Dieser Effekt ließ sich jedoch nach 48 h nicht mehr beobachten (Daten nicht gezeigt). Obwohl es sich bei beiden Stämmen um *P. aeruginosa*-Brandwundenisolate handelt, unterscheiden sich deren Genome deutlich. Für PA14 wurden 392 zusätzliche Gene vorhergesagt und die Genomidentität beider Stämme liegt nur bei 95 %, aufgrund dessen wahrscheinlich das unterschiedliche Wachstumsverhalten zustande kommt (Liberati *et al.*, 2006).

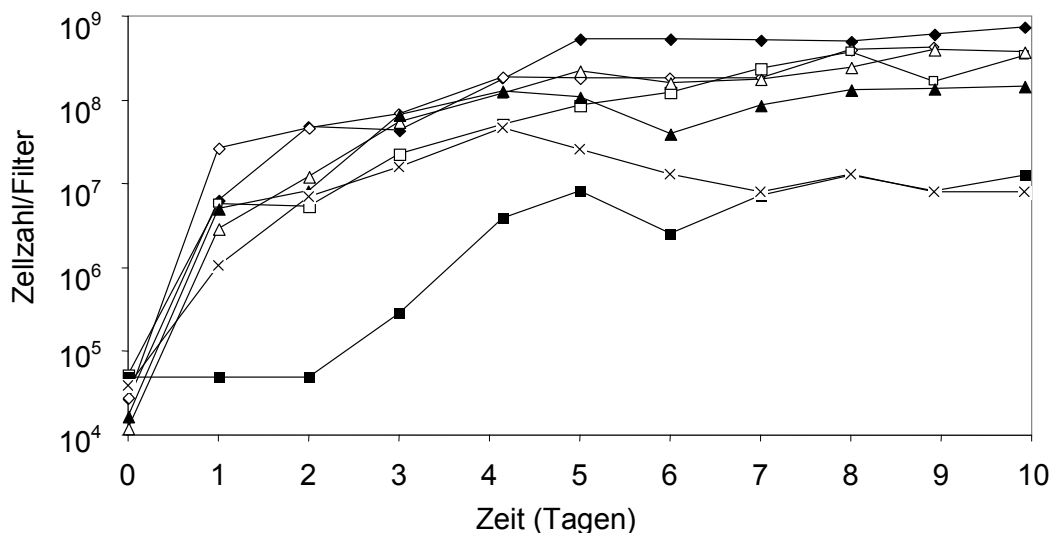


Abb. 10: Wachstumskurven von Koloniebiofilmen unterschiedlicher klinischer Isolate auf ASM-Agar mit physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen. Ausgefüllte Raute: Wildtyp PA14, leere Raute: PAO1, leeres Quadrat: BT2, ausgefülltes Quadrat: BT72, leeres Dreieck: RN3, ausgefülltes Dreieck: RN45, Kreuz: NN84. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. Dargestellt ist die Zellzahl pro Filter über einen Zeitraum von 10 Tagen.

In vorangegangenen SNP-Analysen konnte eine große Ähnlichkeit zwischen den klinischen Isolaten und dem Wildtyp PA14 beobachtet werden, aufgrund der PA14 in diesem Experiment als Referenzstamm verwendet wurde. Mit einer Zellzahl von  $5,4 \times 10^8$  pro Filter erreicht der Wildtyp PA14 bereits nach fünf Tagen die Stationärphase, ebenso wie die klinischen Isolate RN3 und RN45. Letztere zeigen allerdings während der Stationärphase eine geringere Zellzahl von ca.  $2 \times 10^8$  pro Filter. Auch das Isolat NN84 erreicht die Stationärphase im Vergleich zum Wildtyp PA14 mit einer insgesamt geringeren Zellzahl von nur

$4,7 \times 10^7$  pro Filter. Allerdings befindet sich das Isolat bereits nach vier Tagen in der Stationärphase. Das Isolat BT2 hingegen erreicht während der Stationärphase mit einer Zellzahl von  $3,7 \times 10^8$  pro Filter fast das gleiche Niveau des Wildtyps PA14, allerdings erst nach einer Inkubationszeit von acht Tagen. Das Wachstum des Isolats BT72 stagniert während der ersten 48 h, was dadurch bedingt sein könnte, dass der Stamm in der Vorkultur zum Zeitpunkt des Animpfens noch nicht die Stationärphase erreicht hatte und somit eventuelle Anreicherungen von Arginin während des vorangegangenen Wachstums in LB nicht zum Wachstum beitragen. Außerdem kann sich der Stamm möglicherweise langsamer an anaerobe Bedingungen anpassen. Im Folgenden kommt es zu einem Anstieg der Zellzahl bis zu  $1,2 \times 10^8$  pro Filter nach achttägiger Inkubation.

Zusammenfassend dokumentieren die Ergebnisse, dass die klinischen Isolate, die jeweils zu einem früheren (RN4, BT2) und zu einem späteren Zeitpunkt (RN45, BT72) während der Infektion entnommen wurden, in etwa den gleichen Wachstumsphänotyp haben. Die klinischen Isolate zeigen mit Ausnahme von NN84 ein langsames Wachstum als der zugehörige Referenzstamm PA14. Somit konnte insgesamt kein Wachstumsvorteil durch eine bessere Anpassung der Isolate an anaerobe Bedingungen gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. Allerdings ist ein Wachstumsvorteil über einen längeren Zeitraum durchaus möglich, was hier nicht genauer untersucht wurde. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die Zusammensetzung des Sputums je nach Patient und Grad der Erkrankung unterschiedlich ist. Unter diesen Bedingungen haben sich die entsprechenden Isolate eventuell an andere Mikrohabitate angepasst. Darüber hinaus kann die Behandlung der Patienten mit Antibiotika zu einem Selektionsdruck geführt haben, der bestimmte Stämme selektiert, die nicht unbedingt besser angepasst sind, sondern auch über entsprechende Antibiotikaresistenzen verfügen.

### 3.4 Methioninauxotrophie in CF-Isolaten

Klinische Isolate von *P. aeruginosa*, die aus der Lunge von CF-Patienten isoliert wurden, zeigen häufig eine oder mehrere Auxotrophien (Taylor *et al.*, 1992). Am häufigsten kommen methioninauxotrophe Stämme vor (38 %), aber auch Synthesewege der Aminosäure Arginin (8 %), Leucin (8 %) und Histidin (4 %) sind betroffen (Barth & Pitt, 1995).

### 3.4.1 Identifizierung methioninauxotropher CF-Isolate

Vorliegende klinische Isolate der Medizinischen Hochschule Hannover wurden auf eine mögliche Methioninauxotrophie hin untersucht. Dazu wurden die Stämme auf AB-Minimalmedium ausgestrichen. Konnte kein Wachstum beobachtet werden, wurde Methionin (20 µg/ml) hinzugesetzt und erneut auf Wachstum überprüft. Dadurch konnten die klinischen Isolate BT72 und 65 als methioninauxotroph identifiziert werden.

Der letzte Schritt in der Biosynthese von Methionin ist die Methylierung von Homocystein. In *E. coli* wird dieser entweder über eine Vitamin B<sub>12</sub>-abhängige Reaktion durch das von *metH* kodierte Protein oder in einer Vitamin B<sub>12</sub>-unabhängigen Reaktion über das von *metE* kodierte Protein katalysiert (Fogolino *et al.*, 1995). Dies wird auch für *P. aeruginosa* postuliert und für *Pseudomonas putida* wurde eine Beteiligung beider Enzyme an der Methioninbiosynthese gezeigt (www.genome.jp/kegg) (Alaminos & Ramos, 2001) (Abb. 11).

Um eine Vitamin B<sub>12</sub>-abhängige Auxotrophie auszuschließen zu können, welches als Kofaktor essentiell für die Funktion von *metH* ist, wurde des weiteren das Wachstum der Isolate auf AB-Minimalmedium unter Zugabe von Vitamin B<sub>12</sub> (10 pg/ml bis zu 1 µg/ml) untersucht. Dabei übernimmt Vitamin B<sub>12</sub> auch eine regulatorische Funktion und hemmt in höheren Konzentrationen zusammen mit einem funktionellen *metH* die Expression von *metE* (Urbanowski *et al.*, 1987). Da sich kein Wachstum zeigte, kann sicher davon ausgegangen werden, dass entsprechende klinische Isolate mindestens einen Defekt in der Methioninbiosynthese aufweisen.

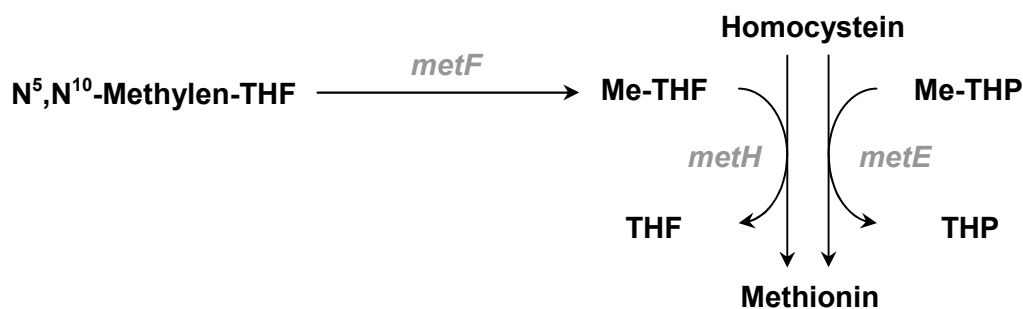


Abb. 11: Schematischer Ausschnitt aus der Methioninbiosynthese von *P. aeruginosa* (Heurlier *et al.*, 2006). Die Methylierung von Homocystein zu Methionin wird entweder durch N<sup>5</sup>-Methyltetrahydropteroyl-triglutamat (Me-THP) in einer Vitamin B<sub>12</sub>-unabhängigen Reaktion über das von *metE* kodierte Protein vermittelt oder in einer Vitamin B<sub>12</sub>-abhängigen Reaktion durch das von *metH* kodierte Protein katalysiert, bei der die Methylgruppe von N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat (Me-THF) übertragen wird. Me-THF wird durch *metF* aus N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylen-tetrahydrofolat bereitgestellt.

### 3.4.2 Identifizierung von *metF* als verantwortliches Gen für die Methioninauxotrophie

Um das für die Methioninauxotrophie verantwortliche Gen zu identifizieren, wurden die klinischen Isolate mit einer PAO1 Cosmid-Bank komplementiert (siehe Abschnitt 2.5.13). Nach der Ausplattierung auf AB-Minimalmedium mit Tetracyclin, konnten 15 prototrophe Klone isoliert werden. Nach erneutem Überimpfen zeigten noch 13 Klone Wachstum auf AB-Minimalmedium. Somit konnte bei diesen Klonen von einer Komplementation der Methioninauxotrophie durch das enthaltene Cosmid ausgegangen werden. Die Cosmide wurden aus *P. aeruginosa* isoliert (siehe Abschnitt 2.5.10) und *E. coli* DH10B mit diesen transformiert, um größere Cosmidmengen präparieren zu können (siehe Abschnitt 2.5.8). Anschließend wurden die Cosmide in größeren Mengen aus *E. coli* isoliert (Abschnitt 2.5.10) und daraufhin einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *HindIII* unterzogen, um die Inserts aus den Cosmidvektoren zu entfernen und spezifisch zu schneiden. Die Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Restriktionsmuster miteinander verglichen. Die Enden der Inserts von Cosmiden mit unterschiedlichem Restriktionsmuster wurden sequenziert (siehe Abschnitt 2.5.4). Über einen Sequenzvergleich mit Hilfe einer Datenbank wurde die entsprechende Sequenz in dem Genom identifiziert (Winsor *et al.*, 2009). Diese konnte auf 16,3 kb eingeschränkt werden und ist mit annotierten Genen in Abb. 12 zu sehen.

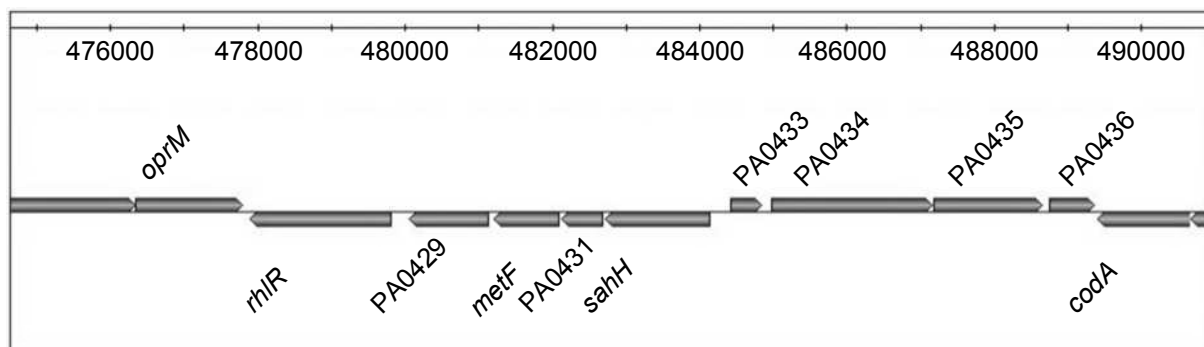


Abb. 12: Annotierte Gene von *P. aeruginosa* von Basenposition 474648 bis 490920 (www.prodoric.de).

Barth und Kollegen hatten bereits 1998 versucht das verantwortliche Gen für eine Methioninauxotrophie in *P. aeruginosa* zu identifizieren und postulierten, dass das verantwortliche Protein die Reaktion von Homocystein zu Methionin katalysiert (Barth *et al.*, 1998), was *metH* und *metE* entspricht (siehe auch Abb. 11). Beide Gene wurden im Sequenzvergleich nicht gefunden. Das Gen *metF* wurde als potentieller Kandidat identifiziert, da ein

methionin-auxotropher Phänotyp bei einer Deletion von *metF* bereits für *E. coli* beschrieben wurde (Ahmed, 1973).

Als etabliertes Verfahren zur Einbringung eines Plasmids in gram-negative und gram-positive Bakterien sowie Actinobacteria wird das diparentale Mating mit *E. coli* S17 (Simon *et al.*, 1983) angewandt. Dabei wird häufig eine Selektion des auxotrophen *E. coli* Donors mit Minimalmedium durchgeführt. Eine Selektion mit Minimalmedium war aufgrund der zu erwartenden Methioninauxotrophie von PAO1  $\Delta metF$  nicht möglich. Daher wurde nach der Methode von Datsenko & Wanner (2000) das *hemA*-Gen von *E. coli* S17 durch homologe Rekombination mit einer Kanamycin-Resistenzkassette eliminiert (Abschnitt 2.5.11.1), die in einem zweiten Schritt entfernt wurde (Abschnitt 2.5.12). Die unmarkierte Mutante wurde *E. coli* ST18 benannt und für diparentale Matings verwendet.

Das *hemA*-Gen von *E. coli* kodiert eine Glutamyl-tRNA Reduktase, die den ersten Schritt der Tetrapyrrolbiosynthese katalysiert und essentiell ist. Eine Deletion des Gens führt zum Wachstumsstopp aufgrund des Tetrapyrrolmangels und kann durch Zugabe von 5-Aminolevulinsäure komplementiert werden (Chen *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1989). Durch die Verwendung des *E. coli* ST18 Stammes für diparentale Matings entfällt die Selektion von *E. coli*, da ein Wachstum des Stammes ohne Zugabe von 5-Aminolevulinsäure nicht möglich ist und somit die Erzeugung auxotropher *P. aeruginosa*-Stämme durch Selektion auf Vollnährmedium realisierbar ist (Thoma & Schobert, 2009).

Eine  $\Delta metF$ -Mutante in PAO1 konnte mit Hilfe des Stammes *E. coli* ST18 erstellt werden (siehe Abschnitte 2.5.11.2 und 2.5.12). Die verwendeten Primer sind in Tab. 5 zu finden. Die unmarkierte Mutante PAO1  $\Delta metF$  wurde bezüglich ihres Wachstumsphänotyps untersucht. In LB-Medium konnte kein Unterschied im Wachstumsverhalten gegenüber dem Wildtyp PAO1 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Nach dem Ausstreichen auf AB-Agar konnte kein Wachstum festgestellt werden. Durch Zugabe von Methionin (20 µg/ml) war ein Wachstum analog zum Wildtyp zu beobachten.

Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Deletion von *metF* in *P. aeruginosa* PAO1 zu einer Methioninauxotrophie führt. Dieses Ergebnis könnte vermuten lassen, dass der letzte Schritt der Methioninbiosynthese in *P. aeruginosa* wahrscheinlich identisch zu *E. coli* ist. Die Methylierung von Homocystein in *E. coli* kann sowohl durch *metE* unter der Verwendung des spezifischen Methylgruppendonors Me-THP als auch durch *metH* un-

ter der Verwendung der Methylgruppedonoren Me-THF und Me-THP realisiert werden (Guest *et al.*, 1964; Winzer *et al.*, 2002). Zu dieser Reaktion finden sich aber auch Publikationen, die ausschließlich auf THF als Methylgruppedonor für beide Enzyme verweisen (Thanbichler *et al.*, 1999). Weiterhin wird THF teilweise als Bezeichnung für beide Verbindungen (THF und THP) verwendet (Burton *et al.*, 1969). Dabei ist das von *metF* kodierte Protein von *E. coli* in der Lage beide Methylgruppedonoren bereitzustellen (Ahmed, 1973; Katzen & Buchanan, 1965). Aufgrund dieser unterschiedlichen Meinungen lassen sich keine eindeutigen Aussagen über die Enzymaktivitäten von *P. aeruginosa* treffen.

Somit muss das hier gezeigte Schema von Heulier (2006) ebenso in Frage gestellt werden. Möglich ist zwar, dass die Methylierungsreaktion einzig von *metH* katalysiert wird und *metE* keinen Einfluss auf die Methylierungsreaktion hat. Für *P. putida* wurde allerdings keine Methioninauxotrophie einzelner  $\Delta metH$ - oder  $\Delta metE$ -Mutanten gezeigt, sondern nur einer  $\Delta metH\Delta metE$  Doppelmutante (Alaminos & Ramos, 2001).

Um sicherzustellen, dass die Methioninauxotrophie der klinischen Isolate BT72 und 65 sowie PAO1  $\Delta metF$  ausschließlich durch die fehlende Funktion des von *metF* kodierten Proteins ausgelöst wird und nicht durch weitere geno- oder phänotypische Veränderungen bedingt ist, wurde eine Komplementation mit dem *metF*-Gen durchgeführt. Dazu wurde der Vektor pST09 konstruiert, der ausschließlich das *metF*-Gen unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters enthält. *E. coli* ST18 wurde mit diesem Plasmid transformiert und über diparentale Matings wurde es in die Stämme eingebracht.

Nachdem plasmidtragende Klone auf LB-Agar mit Carbenicillin isoliert wurden, konnte die erfolgreiche Komplementation der Methioninauxotrophie durch Wachstum auf AB-Minimalmedium nachgewiesen werden. Somit konnte *metF* als verantwortliches Gen für die Methioninauxotrophie der klinischen Isolate identifiziert werden. Weitere methioninauxotrophe Isolate sollten untersucht werden, um zu klären, ob die Mutation von *metF* möglicherweise häufig an einer Methioninauxotrophie beteiligt ist. Eventuell könnte *metF* zu den, in *P. aeruginosa* während der Infektion häufig mutierten Genen zählen, wie auch z. B. *muca*, *rhlR* oder *lasR* (Smith *et al.*, 2006). Möglich ist sogar, dass bevorzugt eine Base mutiert wird, ein so genannter „hot spot“. Dieser, zum Funktionsverlust führende, Mechanismus wurde bereits für *muca* gezeigt (Bragonzi *et al.*, 2006).



Es wird vermutet, dass *P. aeruginosa*-Stämme besser angepasst sind, wenn sie Auxotrophien für in ihrer Umgebung im Überfluss vorhandene Substanzen aufweisen, wie z. B. Aminosäuren in der CF-Lunge. Dadurch sollen die Stämme einen Wachstumsvorteil haben und aus diesem Grund selektioniert werden (Taylor *et al.*, 1992).

Eine weitere mögliche These zur Erklärung der großen Anzahl methioninauxotropher Stämme im Vergleich zu anderen Aminosäureauxotrophien, ist in der Verbindung zum *quorum sensing* zu finden. Methionin und das durch die katalytische Aktivität von MetK aus Methionin gebildete S-Adenosylmethionin sind Vorläufer von Acetylhomoserinlaktone (AHLs), den Signalmolekülen des *quorum sensings*. Viele klinische Isolate haben einen Defekt im *quorum sensing*. Am häufigsten geht das mit Mutationen in den Transkriptionsregulatorgenen *lasR* und *rhlR* einher (Heurlier *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass *quorum sensing*-Mutanten einen Wachstumsvorteil während der Stationärphase haben und sie eine geringere Virulenz im Vergleich zum Wildtyp zeigen, was ein Vorteil bei der Interaktion mit dem Wirt sein kann und auch von anderen Gruppen beobachtet wurde (Smith *et al.*, 2006). Außerdem wird argumentiert, dass die Bildung der AHLs zu viel Energie kostet und dadurch AHL-defiziente Stämme ebenso einen Wachstumsvorteil haben (Heurlier *et al.*, 2006; Keller & Surette, 2006). Andererseits sollen nur 0,01 % des ATP-Gehalts einer Zelle zur Synthese von AHLs benötigt werden, basierend auf dem ATP-Gehalt von *E. coli* (Haas, 2006). Hingegen hat das *quorum sensing*-System einen Einfluss auf die Expression von 6 % bis 10 % aller *P. aeruginosa*-Gene, was bei entsprechenden Mutanten wahrscheinlich zu einer Energieeinsparung beiträgt (Heurlier *et al.*, 2006).

Die Mutation im *metF*-Gen resultiert in einer geringeren Methioninkonzentration in der Zelle, da nur noch exogenes Methionin zur Verfügung steht. Möglicherweise führt dies zu einer geringeren Synthese von AHLs und könnte damit einen Selektionsvorteil bieten.

### 3.4.3 *metF* und *quorum sensing*

Um zu untersuchen, ob die Mutation von *metF* einen Einfluss auf die AHL-Synthese und damit auf das *quorum sensing* hat, wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt. Zum einen wurde die Konzentration von AHLs direkt mit Hilfe des  $\alpha$ -Proteobakteriums *Agrobacterium tumefaciens* nachgewiesen. Allerdings konnten keine eindeutigen Ergebnisse gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Zum anderen kann als indirekter Nachweis von AHLs der von *P. aeruginosa* gebildete Farbstoff Pyocyanin dienen, dessen Synthese *quorum sensing*-abhängig ist (Winstanley & Fothergill, 2009). Pyocyanin lässt sich leicht durch eine Chloroform-Extraktion isolieren.

Für diese Untersuchung wurden Überstände von Stationärphasekulturen in LB-Flüssigmedium vom Wildtyp PAO1, der  $\Delta metF$ -Mutante sowie LB-Medium als Negativ-Kontrolle verwendet und der extrahierte Farbstoff gegen reines Chloroform bei 695 nm vermessen (siehe Abschnitt 2.4.9).

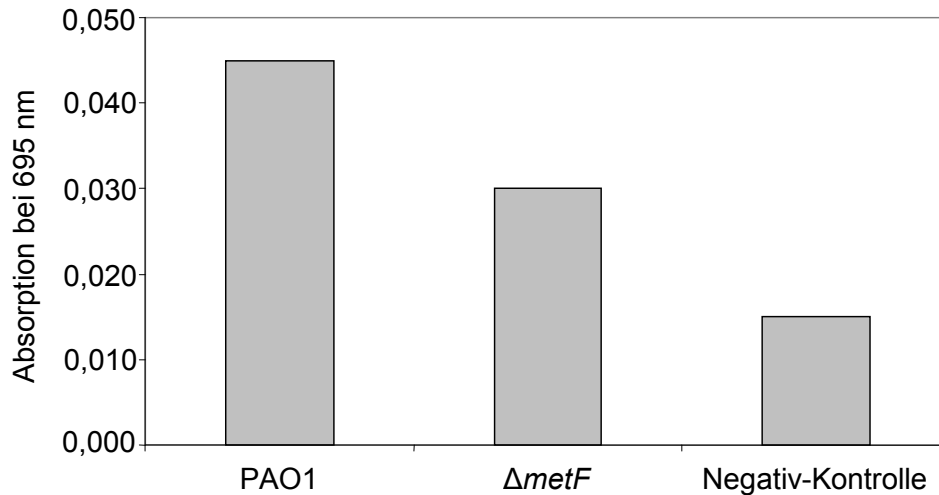


Abb. 13: Absorptionsmessung von extrahiertem Pyocyanin des Wildtyps PAO1 und der  $\Delta metF$  Mutante. Als Negativ-Kontrolle wurde nur LB-Medium für die Extraktion verwendet.

Wie in Abb. 13 zu sehen, produziert der Wildtyp mit einer Absorption von 0,045 wesentlich mehr Farbstoff als die  $\Delta metF$ -Mutante, was sich in einer Absorption von 0,03 widerspiegelt. Die Negativ-Kontrolle liegt mit 0,015 unter dem Wert der  $\Delta metF$ -Mutante. Da die  $\Delta metF$ -Mutante in LB-Medium das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp PAO1 zeigte (Daten nicht dargestellt), kann ein Einfluss durch langsames Wachstum ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse dokumentieren eindeutig einen Einfluss von *metF* auf die Pyocyanin-Produktion von PAO1 und lassen somit Rückschlüsse auf eine geringere AHL-Synthese zu. Damit kann die These, dass methioninauxotrophe *P. aeruginosa*-Stämme eine reduzierte Virulenz durch ein vermindertes *quorum sensing*-System aufweisen, untermauert werden.

### 3.5 Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* in ASM

*P. aeruginosa* hat eine intrinsische Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika. Zum einen ist dies bedingt durch die Zellwand, die nahezu undurchlässig ist. Zum anderen verfügt das Bakterium über Gene, die für Antibiotika abbauende bzw. modifizierende Enzyme kodieren oder auch über Effluxpumpen, die sehr effizient Antibiotika aus der Zelle pumpen. Durch Mutation kann eine Veränderung der Antibiotikazielstruktur erfolgen sowie die Genexpression von resistenzvermittelnden Regulatoren und Antibiotikaaufnahmekanischen beeinflusst werden (Lambert, 2002). Unter *in vitro* Bedingungen wird die Antibiotikaresistenz des Bakteriums größtenteils in planktonischen Kulturen getestet. Während in diesen Experimenten eine erfolgreiche Abtötung der Bakterien durch bestimmte Mengen Antibiotika möglich ist, sind die gleichen Konzentrationen bei der Behandlung von *P. aeruginosa*-Infektionen in der CF-Lunge nicht mehr wirksam. Das Wachstum von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge ist charakterisiert durch eine hohe Antibiotikaresistenz und chronische Infektionen sind selbst durch intensive Antibiotikabehandlung nicht mehr kontrollierbar (Ratjen & Döring, 2003). Dies wird größtenteils dem Wachstum in antibiotika- und phagozytenresistenten Biofilmen zugeschrieben, aber auch das einzigartige Milieu in der CF-Lunge scheint einen Beitrag zur Antibiotikaresistenz zu leisten (Hassett *et al.*, 2009). Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob anaerobe Wachstumsbedingungen in ASM zu einer Antibiotikaresistenz führen.

#### 3.5.1 Bestimmung minimaler inhibitorischer Konzentrationen

Zunächst wurde die minimale inhibitorische Konzentration (engl. MIC) unterschiedlicher Antibiotika für den *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 bestimmt, wie unter Abschnitt 2.4.6 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengefasst und liegen im Bereich von bereits beschriebenen Konzentrationen (Borriello *et al.*, 2004).

Tab. 10: MICs unterschiedlicher Antibiotika für *P. aeruginosa* PAO1.

Antibiotikum	MIC (µg/ml)
Carbenicillin	80
Ceftazidim	1
Ciprofloxacin	0,6
Meropenem	2
Rifampicin	100
Tobramycin	5

### 3.5.2 Antibiotikaresistenz in Abhängigkeit von der Nitrat-Konzentrationen

Unter Laborbedingungen werden Experimente zur Antibiotikaresistenz meist in LB-Medium mit planktonisch wachsenden Zellen durchgeführt. Selten erfolgt eine Inkubation unter anaeroben Bedingungen oder in Biofilmen, obwohl im CF-Lungenhabitat diese Wachstumsbedingungen charakteristisch für *P. aeruginosa* sind. Aber selbst wenn diese Parameter für einen Antibiotikatest herangezogen werden, wird die Standard-Nitrat-Konzentration für anaerobe Experimente von 50 - 100 mM verwendet (Borriello *et al.*, 2004), ohne Berücksichtigung der physiologischen Konzentrationen in der CF-Lunge. Neben Nitrat ist in der CF-Lunge auch Nitrit vorhanden. Die Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen variieren je nach Patient zwischen 73  $\mu$ M und 792  $\mu$ M (Grasemann *et al.*, 1998; Hassett, 1996; Linnane *et al.*, 1998; Palmer *et al.*, 2007b).

Um die Antibiotikaresistenz in Abhängigkeit von verschiedenen Nitratkonzentrationen zu untersuchen, wurden Koloniebiofilme wie unter Abschnitt 2.4.4 beschrieben, beimpft und für 24 h anaerob bei 37 °C auf ASM-Agar mit unterschiedlichen Nitrat-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Biofilme auf neue Platten transferiert, die die 10-fache MIC von Tobramycin enthielten (50  $\mu$ g/ml). Nach weiteren 12 h Inkubation wurde die Lebendzellzahl (Abschnitt 2.4.3) bestimmt. Anschließend wurde die Zellzahl der antibiotikaexponierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Biofilmen betrachtet und die Überlebensrate in Prozent bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 zu sehen.

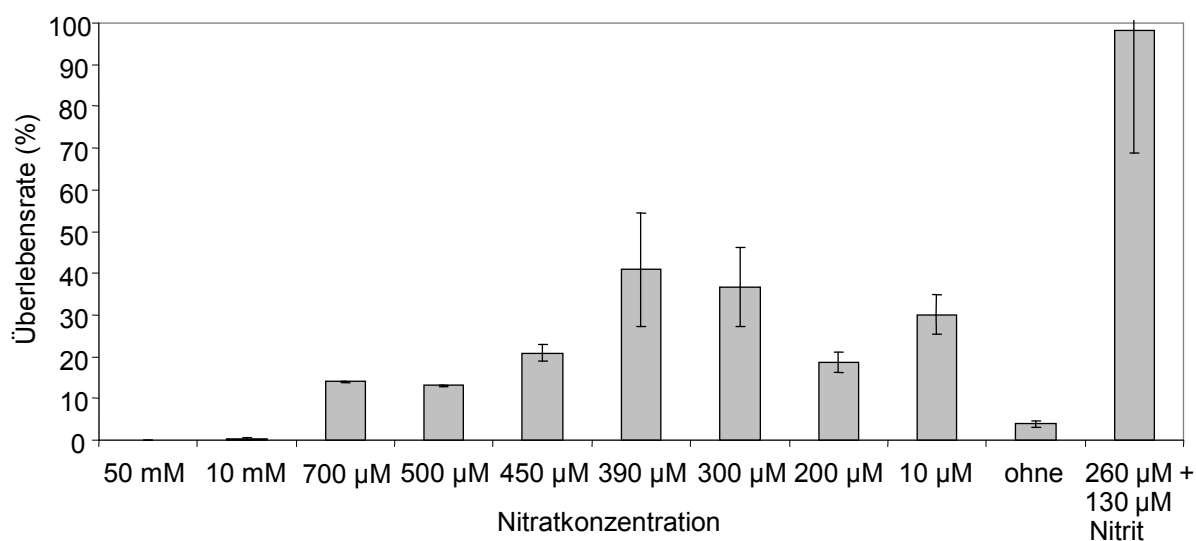


Abb. 14: Überlebensrate in Prozent von *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilmen die 24 h anaerob bei 37 °C auf ASM-Agar mit unterschiedlichen Nitrat-Konzentrationen inkubiert wurden, gefolgt von einer anschließenden Behandlung mit 50  $\mu$ g/ml Tobramycin für 12 h. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt und die Überlebensrate im Vergleich zu unbehandelten Biofilmen berechnet.

Bei Nitrat-Konzentrationen von 50 mM, die normalerweise für anaerobe Experimente verwendet werden, können Überlebensraten von 0,07 % nach Behandlung mit Tobramycin beobachtet werden. Mit abnehmenden Nitrat-Konzentrationen steigt die Antibiotikaresistenz vom *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 von einer 14 %igen Überlebensrate bei Inkubation mit 700  $\mu$ M bis zur maximalen Überlebensrate von 41 % bei Zusatz von 390  $\mu$ M Nitrat. Auch bei 300  $\mu$ M ist noch eine Überlebensrate von 37 % zu beobachten, wobei die Überlebensrate mit weiter fallender Nitrat-Konzentration bis zu einer 4 %igen Überlebensrate abnimmt, wenn die Biofilme ohne Nitrat inkubiert wurden.

Diese Ergebnisse dokumentieren eindeutig, dass bei Konzentrationen, die ungefähr physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen der CF-Lunge entsprechen, eine starke Zunahme der Antibiotikaresistenz stattfindet, wie es auch in der Lunge von CF-Patienten zu beobachten ist. Eine mögliche Erklärung für die ansteigende Antibiotikaresistenz können unterschiedliche Wachstumsphasen sein. Allerdings wurde beschrieben, dass Stationärphasezellen weitaus resistenter gegenüber Antibiotika sind, als exponentiell wachsende Kulturen (Aaron *et al.*, 2002). Daher liegt wahrscheinlich kein bedeutender Einfluss der Wachstumsphase vor, da die Zellen, wie unter Abschnitt 3.1.2 gezeigt, bei einer Inkubation mit 50 mM Nitrat bereits nach 24 h die Stationärphase erreichen. Im Gegensatz dazu unterstützen geringere Nitrat-Konzentrationen ein langsames Wachstum und entsprechende Koloniebiofilme befinden sich nach 24 h noch nicht in der Stationärphase. Entgegen den Ergebnissen aus Abb. 14 hätten diese Biofilme eigentlich sensibler gegenüber Antibiotika sein müssen.

Außerdem zeigen diese Daten sehr eindrucksvoll, dass man die bislang vertretene Meinung, eine geringe metabolische Aktivität der Zellen sei größtenteils für die Antibiotikaresistenz verantwortlich, überdenken sollte (Stewart, 2002; Walters *et al.*, 2003). Das langsamste Wachstum wurde während einer Inkubation auf ASM-Agar ohne Zusatz von Nitrat (siehe Abschnitt 3.1.2) beobachtet, wobei die Zellen vermutlich auch die geringste metabolische Aktivität aufweisen. Hierbei zeigt sich eine Überlebensrate von nur 4 % im Gegensatz zu einer 41 %igen Überlebensrate während der Inkubation mit 390  $\mu$ M Nitrat.

Werden die physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentration der CF-Lunge von 130  $\mu$ M Nitrit und 260  $\mu$ M Nitrat verwendet (wie auch schon in Abschnitt 3.1.2), haben diese einen noch stärkeren Einfluss auf die Antibiotikaresistenz im Vergleich zur Inkubation mit 390  $\mu$ M Nitrat. Dabei konnten Überlebensraten von bis zu 98 % beobachtet werden (Abb. 14).

Aufgrund der höheren Antibiotikaresistenz wurden für weitere Experimente die durchschnittlichen physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen der CF-Lunge verwendet. In Ver-

gleichsexperimenten mit LB-Agar und physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen konnte die entsprechende Antibiotikaresistenz nicht beobachtet werden. Die Zellen zeigten eine vergleichbare Sensitivität wie bei einer Inkubation auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat (siehe hierzu Abschnitt 3.5.3). Dies zeigt eindeutig, dass nur die Zusammensetzung des ASMs in Kombination mit den entsprechenden Nitrat-Konzentrationen zu einer erhöhten Antibiotikaresistenz von PAO1 unter anaeroben Bedingungen im Koloniebiofilm führt.

Um zu überprüfen ob Tobramycin und andere verwendete Antibiotika in ASM- oder LB-Agar bzw. durch die verwendeten PVDF-Filter frei diffundieren können, wurde ein Durchlässigkeitstest (siehe Abschnitt 2.4.8) durchgeführt. Es konnte kein Unterschied zwischen Medien, Filtern und Referenz festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Somit können die Antibiotika frei durch das ASM und die Koloniebiofilme diffundieren und es besteht kein Einfluss auf die Antibiotikakonzentration. Die beobachteten Resistenzen sind daher nicht auf experimentelle Einschränkungen zurückzuführen.

### **3.5.3 Antibiotikaresistenz während der Stationärphase**

Um auszuschließen, dass die in Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Unterschiede in der Antibiotikaresistenz vom Wildtyp PAO1 aufgrund von unterschiedlichen Wachstumsphasen zustande gekommen sind, wurde die Resistenz gegenüber unterschiedlichen Antibiotika erneut überprüft, sobald die Biofilme die Stationärphase erreicht hatten. Dazu wurden die Zellen auf ASM-Agar mit physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen inkubiert, da unter diesen Bedingungen die höchste Antibiotikaresistenz beobachtet wurde. Als Referenzmedium wurde LB-Agar mit 50 mM Nitrat verwendet. Wie unter Abschnitt 3.1.2 beschrieben, erreichen Zellen bei einer Inkubation mit 50 mM Nitrat nach 24 h die Stationärphase während Biofilme, die mit physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen inkubiert wurden, nach sechs Tagen die Stationärphase erreichten.

Insgesamt wurden sechs Antibiotika getestet, die zu vier unterschiedlichen Antibiotikaklassen gehören. Die Antibiotika Carbenicillin, Meropenem und Ceftazidim gehören zur Gruppe der  $\beta$ -Laktame und inhibieren die Peptidoglykansynthese der Zellwand, was zum Platzen der Zelle führt. Das Quinolon Ciprofloxacin hemmt die DNA-Gyrase und damit die DNA-Replikation, die Proteinbiosynthese wird durch Bindung des Aminoglykosids Tobramycin an die 30S Untereinheit der Ribosomen gehemmt und das Rifamycin Rifampicin hemmt die RNA-Polymerase. Nach dem Eintritt in die Stationärphase werden die Biofilme der 10-fachen MIC (Abschnitt 3.5.1) entsprechender Antibiotika ausgesetzt. Eine

Ausnahme bildet Rifampicin, das nur in der einfachen MIC verwendet werden kann. Andernfalls würde das als Lösungsmittel genutzte Methanol einen inhibitorischen Effekt haben. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt und die Überlebensrate im Vergleich zu unbehandelten Biofilmen ermittelt (Abb. 15).

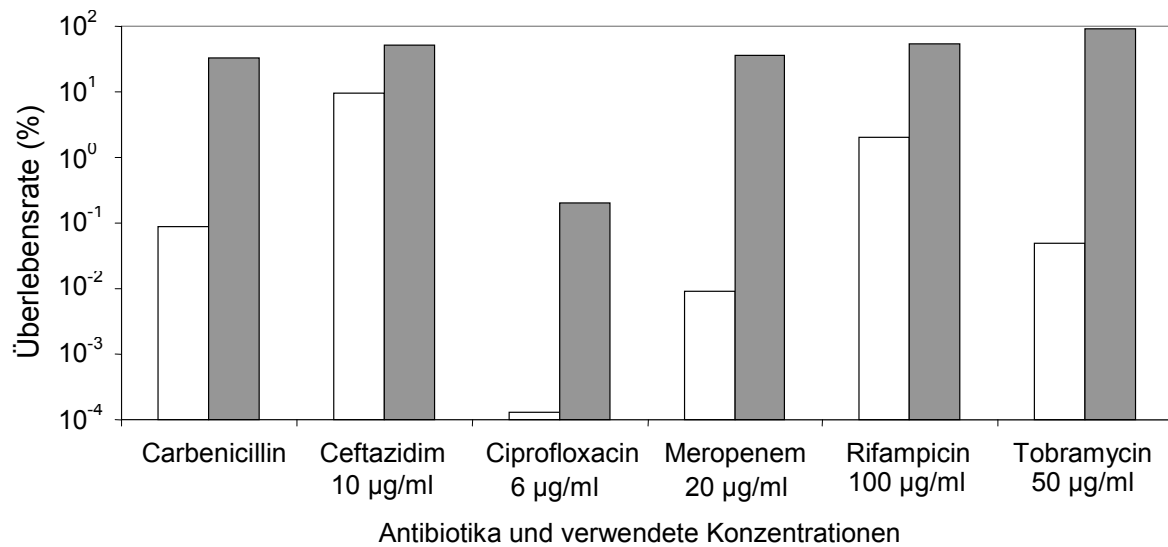


Abb. 15: Durchschnittliche Überlebensrate in Prozent von *P. aeruginosa* PAO1 Stationärphase-Biofilmen während der anaeroben Inkubation auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat (weiße Balken) oder ASM mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen (graue Balken) nach der Behandlung mit unterschiedlichen Antibiotika für 12 h. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt und die Überlebensrate im Vergleich zu unbehandelten Biofilmen berechnet.

Nach der Behandlung der Biofilme mit unterschiedlichen Antibiotika zeigt sich für jedes Antibiotikum die gleiche Tendenz: Biofilme, die auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat inkubiert wurden, zeigen eine große Anfälligkeit gegenüber unterschiedlichsten Antibiotika, während die Bakterien in deutlich geringerer Zahl abgetötet werden, wenn die Inkubation auf ASM-Agar mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen erfolgt (Abb. 15). Dabei liegt die Überlebensrate der Zellen nach einer Tobramycin-Behandlung auf ASM mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen während der Stationärphase bei 98 % während sie nach 24-stündiger Inkubation bei 98 % mit einer Standardabweichung von 30 % lag (siehe Abb. 14). Da die Standardabweichung nicht während des Stationärphasewachstums ermittelt wurde, kann lediglich festgestellt werden, dass die Überlebensraten während beider Wachstumsphasen vergleichbar sind. Aus diesem Grund können keine eindeutigen Aussagen darüber getroffen werden, ob es unter diesen Bedingungen zu einer Zunahme der Antibiotikaresistenz während der Stationärphase kommt.

Nach einer Behandlung der Koloniebiofilme mit Carbenicillin überleben nur 0,09 % eine Inkubation auf LB-Agar im Gegensatz zu einer 33 %igen Überlebensrate bei der Inkubation mit ASM. Der gleiche Trend zeigt sich für Cefazidim (10 % Überlebensrate auf LB-Agar, 51 % auf ASM-Agar), Ciprofloxacin (0,00001 % für LB-Agar, 0,2 % für ASM-

Agar), Meropenem (LB-Agar: 0,01 %, ASM-Agar: 37 %), Rifampicin (LB-Agar: 2 %, ASM-Agar: 54 %) und Tobramycin (LB-Agar: 0,05 %, ASM-Agar: 90 %). Dabei ist die hohe Resistenz gegenüber Rifampicin nur eingeschränkt mit den Ergebnissen der anderen Antibiotika zu vergleichen, da für diese Untersuchung nur die einfache MIC verwendet wurde. Im Durchschnitt lässt sich in ASM eine um 500- bis 600000-fach erhöhte Überlebensrate beobachten.

Während in bisherigen Studien (Anwar *et al.*, 1989; Drenkard, 2003; Mah & O'Toole, 2001; Nickel *et al.*, 1985) dem Biofilmwachstum eine 10- bis 1000-fach erhöhte Antibiotikaresistenz zugerechnet wurde, dokumentieren diese Ergebnisse deutlich, dass die Wachstumsbedingungen einen vergleichbaren bis deutlich größeren Effekt auf die Antibiotikaresistenz haben.

### 3.5.4 Analysen zur Antibiotikaresistenz

Während *P. aeruginosa*-Koloniebiofilme bei der Inkubation auf LB-Medium vergleichsweise anfällig für Antibiotika sind, zeigen die gleichen Biofilme eine größere, z. T. fast vollständige Resistenz gegenüber entsprechenden Antibiotika wenn sie auf ASM inkubiert wurden. Um Gene, Proteine und Metabolite zu identifizieren, die für die Antibiotikaresistenz verantwortlich sind, wurden Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalysen durchgeführt. Des Weiteren können so Aufschlüsse über den Metabolismus von *P. aeruginosa* während des Wachstums auf ASM gewonnen werden.

#### 3.5.4.1 Transkriptomanalyse

Für die Transkriptomanalyse wurde der *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 in Koloniebiofilmen unter anaeroben Bedingungen bis zur Stationärphase auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat und ASM-Agar mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen inkubiert. Die Proben wurden wie unter Abschnitt 2.6 beschrieben, aufgearbeitet. Die Analyse der Mikroarraydaten zeigte im Vergleich zu LB-Medium, dass insgesamt 379 Gene in ASM signifikant induziert und 500 Gene reprimiert wurden.

In Abb. 16 ist die Anzahl der unterschiedlich induzierten bzw. reprimierten Gene nach der n-fachen Veränderung in der Genregulation zu sehen. Die Anzahl von Genen mit unterschiedlicher Regulationsstärke ist vergleichbar.



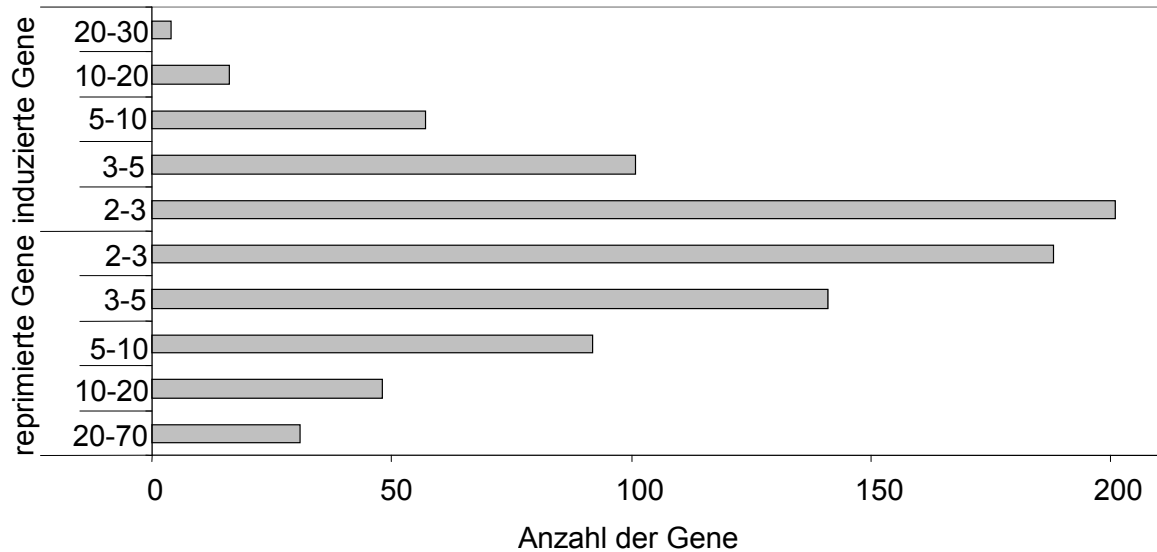


Abb. 16: Übersicht über die im Affimetrix-Mikroarray signifikant regulierten Gene während *P. aeruginosa* PAO1 unter anaeroben Bedingungen in Koloniebiofilmen auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat oder ASM-Agar mit physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen bis zur Stationärphase inkubiert wurde. Die Zahlen der vertikalen Achse geben die n-fache Regulation an.

In Abb. 17 sind die unterschiedlich regulierten Gene in funktionelle Klassen eingeordnet. Dabei ist besonders die Induktion einer großen Anzahl von hypothetischen Genen, transkriptionellen Regulatoren und Zweikomponentensystemen (graue Balken) auffällig. Letztere deuten auf eine umfassende Anpassungsreaktion von *P. aeruginosa* auf die veränderten Bedingungen in ASM hin. Im Gegensatz dazu überwiegt bei den verbleibenden funktionellen Klassen die Anzahl reprimierter Gene (schwarze Balken), die auch auf die insgesamt größere Anzahl reprimierter Gene zurückzuführen ist. Besonders auffällig ist jedoch der Anteil reprimierter Gene des Energiemetabolismus zu denen unter anderem die Gene gehören, die Enzyme des Denitrifikationsapparates kodieren.

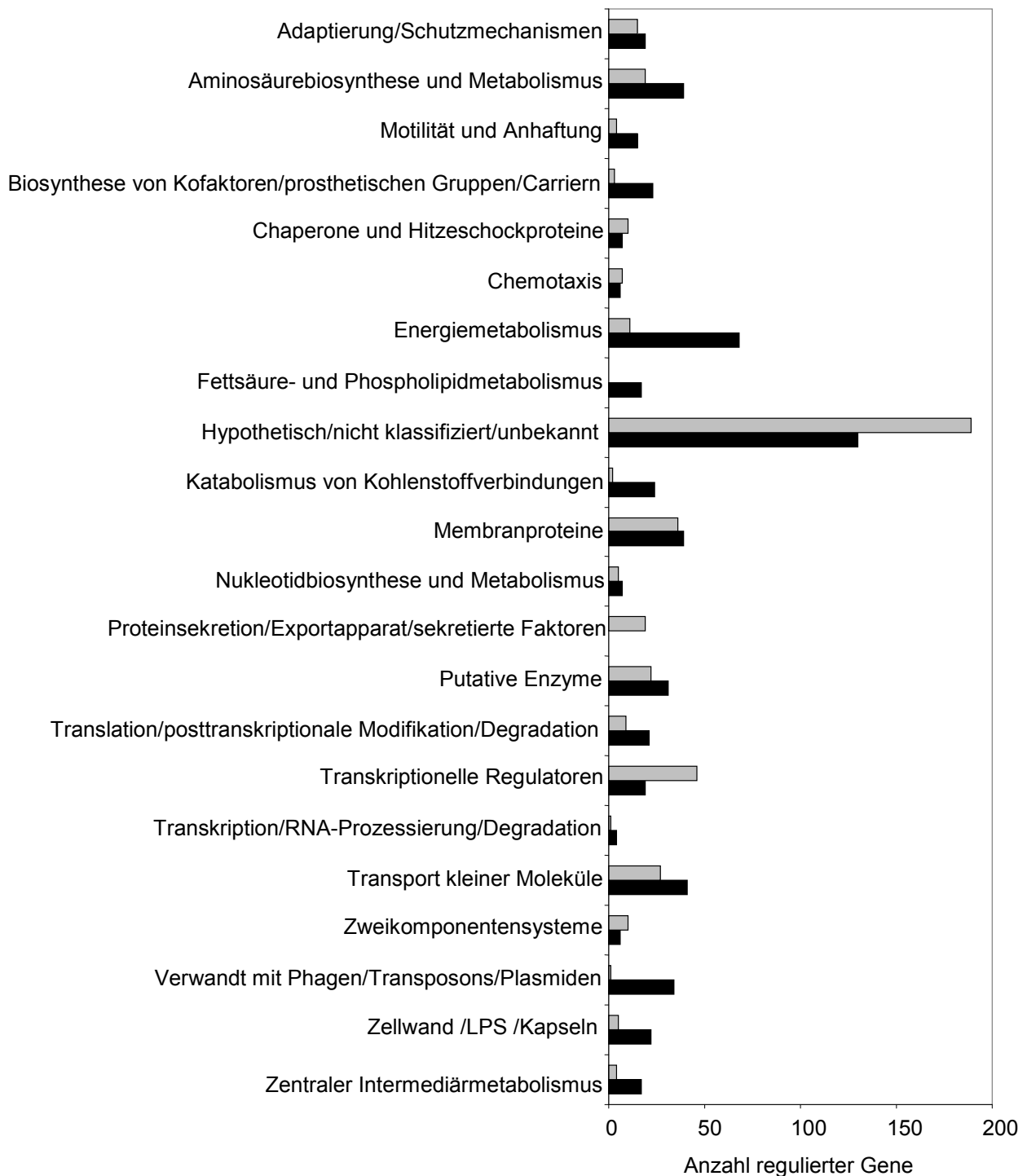


Abb. 17: Durch die Affimetrix-Mikroarray-Analyse ermittelte Anzahl signifikant induzierter (grau Balken) und reprimierter (schwarze Balken) Gene von *P. aeruginosa* PAO1, die unterschiedlichen funktionellen Klassen zugeordnet wurden. Die Inkubation von PAO1 erfolgte unter anaeroben Bedingungen in Koloniebiofilmen auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat oder ASM-Agar mit physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen bis zum Erreichen der jeweiligen Stationärphase.

Eine detaillierter Auswertung erlaubt Tab. 11, in der ausgewählte Gene zu finden sind. Es zeigt sich eindeutig eine stärkere Expression von Genen, die am Transport und Metabolismus von Aminosäuren beteiligt sind. Im Gegensatz dazu werden Gene der Aminosäurebio-

synthese größtenteils reprimiert bzw. nicht signifikant induziert. Paradoxerweise sind auch Gene der Argininfermentation reprimiert, was detaillierter unter Abschnitt 3.5.4.2 diskutiert wird. Weiterhin sind Gene in ASM induziert, die in dem Nukleotidmetabolismus involviert sind sowie in der Pyruvatfermentation.

Die 8 bis 75-fache Reprimierung von Genen der Denitrifikation in ASM ist wahrscheinlich auf die, sich um den Faktor 200 unterscheidenden Nitratkonzentrationen zwischen den Medien zurückzuführen.

Zur Herstellung von ASM wird Lecithin verwendet, das aus Fettsäuren, Glycerin, Phosphorsäure und Cholin besteht. Die erhöhte Expression von Genen, die in den Abbau dieser Substanzen involviert sind (Glycerol- und Cholinmetabolismus, Fettsäuredegradation), lassen vermuten, dass *P. aeruginosa* ebenfalls Lecithin als Energiequelle während des Wachstums auf ASM nutzt. Solche Vermutungen wurden auch für das Wachstum von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge publiziert (Kang *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2007). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass ein Großteil der Gene des Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus reprimiert sind (Abb. 17), was möglicherweise auf größere Mengen entsprechender Moleküle im LB-Medium und deren Metabolisierung durch *P. aeruginosa* zurückzuführen ist. Die induzierte Expression von *phuR*, einem Gen des Eisenmetabolismus, wird auf die im ASM vorliegenden Eisenmangelbedingungen zurückzuführen sein, die durch den Einsatz des Chelators DTPA hervorgerufen werden. Diese Bedingungen liegen ebenso in der CF-Lunge vor und sind sehr wahrscheinlich auch für die Induktion des alternativen Sigmafaktors PvdS verantwortlich, der die Expression von Pyoverdinsynthese- und Virulenzgenen während Eisenmangelbedingungen induziert (Tiburzi *et al.*, 2008).

Zahlreiche Übereinstimmungen mit der hier beobachteten Genregulation können auch während des *in vivo* Wachstums von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge beobachtet werden (Son *et al.*, 2007). Dabei untersuchten Son und Mitarbeiter die Genregulation während des Wachstums direkt in der CF-Lunge im Vergleich zum planktonischen Wachstum des gleichen klinischen Isolats in Minimalmedium mit Citrat als Referenzmedium. Zwar sind diese Untersuchungen nicht exakt mit dem hier verwendeten Referenzmedium LB vergleichbar und ebenso wurde die Untersuchungen unter aeroben Bedingungen durchgeführt, aber trotzdem zeigen sich Übereinstimmungen in der Genregulation. So ist ebenso eine Induktion der Gene für die Aminosäuredegradation *bkdA1*, *hutU* und *dadA* zu finden, wie auch die Gene *purB* und *rhuC* des Nukleotidmetabolismus induziert sind. Darüber hinaus ist eine Induktion aller aufgeführten Gene für den Cholinmetabolismus (*betA*, *betB*, *betI*) und die

Fettsäuredegradation (*fadE*) zu finden wie auch die Induktion von *phuR* des Eisenmetabolismus. Möglicherweise sind diese Genregulationen charakteristisch für das Wachstum von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge.

Die Gruppe von Whiteley (Palmer *et al.*, 2005) untersuchte das Wachstum eines *P. aeruginosa*-Stammes in einer Pufferlösung mit 10% CF-Sputum und führten Transkriptomanalysen mit diesem Medium im Vergleich zu Minimalmedium mit Glukose durch. Ihre Ergebnisse lassen ebenfalls vermuten, dass *P. aeruginosa* in der CF-Lunge durch den Abbau von Aminosäuren überlebt und stehen damit in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen. Auch deren Analysen zeigten Geninduktionen, die sowohl mit den hier vorgestellten Ergebnissen sowie den Analysen von Son *et al.* (2007) übereinstimmen. Dazu gehört die Induktion von *dadA* und *bkdA1*. In *E. coli* ist *dadA* für den Abbau von D-Alanin zu Pyruvat verantwortlich (Franklin & Venables, 1976) und neuste Untersuchungen lassen dieses auch für *P. aeruginosa* vermuten (Boulette *et al.*, 2009). Da Alanin eine bevorzugte Kohlenstoffquelle für *P. aeruginosa* darstellt, ist die Induktion von *dadA* sowie *dadX*, deren Genprodukte für die Alanindissimilation verantwortlich sind, in den Transkriptomanalysen plausibel (Palmer *et al.*, 2007a).

Bemerkenswert ist auch die Induktion des Gens *algU* um den Faktor 5,5. Dieses kodiert für den alternativen Sigma-Faktor AlgU, der eine Resistenz gegenüber extremen Stressbedingungen vermittelt und die Umwandlung vom *P. aeruginosa* zu einem alginatüberproduzierenden Stamm kontrolliert. Diese Überproduktion äußert sich in einem mucoiden Phänotyp, der charakteristisch in der Lunge von CF-Patienten auftritt und mit chronischen Infektionen assoziiert ist (Schurr *et al.*, 1996). Beteiligte Alginatbiosynthesegene sind in vorliegenden Transkriptomanalysen induziert, jedoch ist diese Induktion nicht signifikant. Eine Produktion von Alginat konnte auch für nicht mucoide *P. aeruginosa*-Isolate aus der CF-Lunge kurz nach der Kolonisation gezeigt werden (Bragonzi *et al.*, 2005). Weitere Untersuchungen lassen vermuten, dass AlgU nicht nur die Transkription der Alginatbiosynthesegene induziert, sondern auch die von Lipoproteinen, welche eine erhebliche entzündungsfördernde Aktivität besitzen (Firoved *et al.*, 2002). Des Weiteren kommt es zu einer vermehrten Expression von *algB*, einem Responseregulatorgen, dessen Genprodukt für die Induktion der Alginatbiosynthesegene verantwortlich ist (Leech *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse lassen eine verstärkte Alginatbiosynthese vermuten, während ein Großteil weiterer Virulenzfaktoren reprimiert wird (Tab. 11).

Tab. 11: Ergebnisse der Transkriptomanalyse ausgewählter Gene, die in ASM unterschiedlich reguliert wurden. *P. aeruginosa* PAO1 wurde unter anaeroben Bedingungen in Koloniebiofilmen auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat oder ASM-Agar mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen bis zur entsprechenden Stationärphase inkubiert. Dargestellt ist die n-fache Veränderung der Genexpression. +2 bedeutet, dass das entsprechende Gen in ASM 2-fach stärker induziert wurde als in LB.

PA Nummer	Gen	Beschreibung	n-fache Veränderung
<b>Aminosäuretransport and -abbau</b>			
PA0889	<i>aotQ</i>	Arginin/Ornithin Transportsystem-Permease	+ 2,4
PA0890	<i>aotM</i>	Arginin/Ornithin Transportprotein AotM	+ 2,7
PA0892	<i>aotP</i>	Arginin/Ornithin Transportprotein AotP	+ 2,1
PA1194		Mögliche Aminosäure-Permease	+ 3,5
PA1296		Mögliche 2-Hydroxysäure-Dehydrogenase	+ 3,2
PA2024		Mögliche Dioxygenase	+ 3,5
PA2105		Mögliche Acetyltransferase	+ 2,4
PA2247	<i>bkdA1</i>	2-Oxoisovalerat-Dehydrogenase, α-Untereinheit	+ 2,2
PA3120	<i>leuD</i>	3-Isopropylmalat-Dehydratase, kleine Untereinheit	+ 2,7
PA3121	<i>leuC</i>	3-Isopropylmalat-Dehydratase, große Untereinheit	+ 2,6
PA3175		Mögliche Protein der Arginase-Familie	+ 2,6
PA3418	<i>ldh</i>	Leucin-Dehydrogenase	+ 7,2
PA3862		Hypothetisches Protein	+ 2,4
PA4195		Mögliche Bindungsprotein Komponente eines ABC-Transporters	+ 2,1
PA4588	<i>gdhA</i>	Glutamat-Dehydrogenase	+ 2,1
PA4913		Mögliche Bindungsprotein Komponente eines ABC-Transporters	+ 2,5
PA5036	<i>glbB</i>	Glutamatsynthase-Vorläufer, große Kette	+ 2,2
PA5100	<i>hutU</i>	Urocanase	+ 4,8
PA5111	<i>gloA3</i>	Lactoylglutathionlyase	+ 2,0
PA5139		Hypothetisches Protein	+ 2,3
PA5302	<i>dadX</i>	katabolische Alanin-Racemase	+ 2,3
PA5304	<i>dadA</i>	D-Aminosäure-Dehydrogenase, kleine Untereinheit	+ 7,7
<b>Aminosäurebiosynthese</b>			
PA0296	<i>spuI</i>	Mögliche Glutaminsynthetase	- 2,1
PA0298	<i>spuB</i>	Mögliche Glutaminsynthetase	- 2,5
PA0316	<i>serA</i>	D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	- 3,3
PA0399		Cystathionin-β-Synthase	- 2,7
PA0872	<i>phhA</i>	Phenylalanin-4-Hydroxylase	- 2,4
PA1843	<i>metH</i>	Methioninsynthase	- 3,1
PA1927	<i>metE</i>	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamathomocystein-S-methyltransferase	- 29,6
PA3151	<i>hisF2</i>	Imidazoleglycerolphosphat-Synthase, Cyclase-Untereinheit	- 4,6
PA3152	<i>hisH2</i>	Glutaminamidotransferase	- 2,8
PA3164		3-Phosphoshikimate-1-Carboxyvinyltransferase	- 3,1
PA4402	<i>argJ</i>	Glutamat-N-Acetyltransferase	- 2,1
PA4846	<i>aroQ1</i>	3-Dehydroquinat-Dehydratase	- 2,8
PA5278	<i>dapF</i>	Diaminopimelat-Epimerase	- 2,1
<b>Nukleotidmetabolismus</b>			
PA0134		Mögliche Guanin-Deaminase	+ 4,4
PA2629	<i>purB</i>	Adenylosuccinat-Lyase	+ 2,2
PA2975	<i>rluC</i>	Große ribosomale Untereinheit der Pseudouridine-Synthase C	+ 2,3
PA4645		Mögliche Purin/Pyrimidin-Phosphoribosyltransferase	+ 2,2
PA4758	<i>carA</i>	Carbamoylphosphate-Synthase, kleine Kette	+ 2,1
<b>Cholinmetabolismus</b>			
PA5372	<i>betA</i>	Cholin-Dehydrogenase	+ 5,0
PA5373	<i>betB</i>	Betainaldehyd-Dehydrogenase	+ 6,5
PA5374	<i>betI</i>	Transkriptioneller Regulator BetI	+ 7,6
<b>Fettsäuredegradation</b>			
PA0506	<i>fadE</i>	Mögliche Acyl-CoA-Dehydrogenase	+ 2,4

**Virulenzfaktoren**

PA0026	<i>plcB</i>	Phospholipase C	- 4,4
PA0762	<i>algU</i>	Sigmafaktor AlgU	+ 5,5
PA1130	<i>rhlC</i>	Rhamnosyltransferase 2	- 3,2
PA2193	<i>hcnA</i>	Hydrogencyanid-Synthase HcnA	- 2,0
PA3476	<i>rhlI</i>	Autoinducersyntheseprotein RhlI	-13,8
PA3477	<i>rhlR</i>	Transcriptioneller Regulator RhlR	- 4,8
PA3478	<i>rhlB</i>	Rhamnosyltransferase, Kette B	- 2,0
PA3479	<i>rhlA</i>	Rhamnosyltransferase, Kette A	- 3,9
PA5483	<i>algB</i>	Zweikomponenten-Regulator AlgB	+ 2,2

**Eisenmetabolismus**

PA2426	<i>pvdS</i>	Sigmafaktor PvdS	+ 5,8
PA4710	<i>phuR</i>	Häm/Hämoglobin-Aufnahmerezeptor der äußeren Membran	+ 6,4

**Exoenzyme**

PA0044	<i>exoT</i>	Exoenzym T	+ 3,9
PA1710	<i>exsC</i>	Exoenzym S, Syntheseprotein C	+ 6,2
PA1712	<i>exsB</i>	Exoenzyme S, Syntheseprotein B	+ 3,9
PA1713	<i>exsA</i>	Transkriptioneller Regulator ExsA	+ 3,9

**Antibiotikaresistenz und Effluxtransporter**

PA0425	<i>mexA</i>	Effluxtransporter Membranfusionsprotein MexA	+ 2,5
PA0432	<i>sahH</i>	S-Adenosylhomocystein-Hydrolase	- 3,0
PA0958	<i>oprD</i>	Protein D der äußeren Membran	- 3,4
PA1541		Möglicher Antibiotika-Effluxtransporter	+ 2,6
PA4207	<i>mexI</i>	Möglicher Effluxtransporter	+ 2,5

**Metabolismus**

**Denitrifikation**

PA0509	<i>nirN</i>	Mögliches c-Typ Cytochrom	- 10,0
PA0511	<i>nirJ</i>	Häm <i>d<sub>I</sub></i> Biosyntheseprotein NirJ	- 9,4
PA0514	<i>nirL</i>	Häm <i>d<sub>I</sub></i> Biosyntheseprotein NirL	- 8,5
PA0516	<i>nirF</i>	Häm <i>d<sub>I</sub></i> Biosyntheseprotein NirF	- 14,7
PA0517	<i>nirC</i>	Mögliches c-Typ Cytochromvorprodukt	- 17,0
PA0518	<i>nirM</i>	Cytochrom <i>c<sub>551</sub></i> Vorprodukt	- 28,5
PA0519	<i>nirS</i>	Nitrit-Reduktase	- 32,1
PA0520	<i>nirQ</i>	Regulatorisches Protein NirQ	- 17,9
PA0523	<i>norC</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, Untereinheit C	- 63,8
PA0524	<i>norB</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, Untereinheit B	- 74,7
PA0525		Mögliches Denitrifikationsprotein NorD	- 24,0
PA3392	<i>nosZ</i>	Distickstoffmonoxid-Reduktase, Vorprodukt	- 17,9
PA3872	<i>narI</i>	Nitrat-Reduktase, $\gamma$ -Kette	- 2,5
PA3873	<i>narJ</i>	Nitrat-Reduktase, $\delta$ -Kette	- 3,0
PA3874	<i>narH</i>	Nitrat-Reduktase, $\beta$ -Kette	- 2,8
PA3875	<i>narG</i>	Nitrat-Reduktase, $\alpha$ -Kette	- 2,3

**Argininfermentation**

PA5171	<i>arcA</i>	Arginin-Deiminase	- 2,1
PA5172	<i>arcB</i>	Katabolische Ornithin-Carbamoyltransferase	- 3,3
PA5173	<i>arcC</i>	Karbat-Kinase	- 2,6

**Pyruvatmetabolismus**

PA2298		Mögliche Oxido-Reduktase/ Fumarat-Reduktase	+ 2,0
PA3416		Mögliche Pyruvat-Dehydrogenase E1 Komponente, $\beta$ -Kette	+ 4,0
PA3417		Mögliche Pyruvat-Dehydrogenase E1 Komponente, $\alpha$ -Untereinheit	+ 7,2

**Glycerolmetabolismus**

PA3581	<i>glpF</i>	Glycero-Aufnahmeprotein	+ 6,8
PA3582	<i>glpK</i>	Glycerol-Kinase	+ 3,7
PA3584	<i>glpD</i>	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase	+ 30,5

Die nahezu höchste Expression in Gegenwart von ASM kann für das Gen *glpD* (33-fach) beobachtet werden, welches für eine Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase kodiert. Im Ge-

gensatz zu Son *et al.* (2007), die eine konstitutive Expression für *glpD* beobachtet haben, dokumentieren die vorliegenden Daten eindeutig eine nicht konstitutive Expression, was auch bei anderen Transkriptomanalysen von CF-Isolaten beobachtet wurde (Bielecki, 2009).

Zusammenfassend ermöglicht wahrscheinlich der Abbau von Aminosäuren, DNA und Lecithin ein Wachstum auf ASM-Agar. Zusätzlich wird die Denitrifikation an der Energiegewinnung beteiligt sein, was schon die Untersuchungen unter Abschnitt 3.2 zeigten. Außerdem könnte die Pyruvatfermentation zum Überleben der Zellen beitragen, was die Induktion möglicher Gene des Pyruvatmetabolismus vermuten lässt.

Die Analysen zeigten zwei Gene, die möglicherweise während des Wachstums auf ASM in die Antibiotikaresistenz involviert sein könnten. Zum einen *glpD* (Glycerolmetabolismus, siehe oben) und zum anderen *mexA*, welches als Teil der MexAB-OprM Effluxpumpe eine 2,5-fach höhere Expression zeigte. Auf diese Gene wird detailliert unter Abschnitt 3.5.5 eingegangen. Andere Antibiotikaresistenz-vermittelnde Gene, wie z. B. *aph* und *ahpA*, deren Produkte eine Aminoglycosid-Resistenz durch Modifikation des Antibiotikums vermitteln, wurden in den Transkriptomanalysen nicht höher exprimiert vorgefunden.

#### 3.5.4.2 Proteomanalyse

Zur Proteomanalyse wurde das zwei-dimensionale (2D) Gelelektrophoreseverfahren verwendet, um Veränderungen im Proteinmuster während der Inkubation auf unterschiedlichen Medien zu untersuchen. Dazu wurden *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilme wie unter Abschnitt 2.4.4 beschrieben, beimpft. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat beziehungsweise ASM mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen bis zur Stationärphase. Anschließend wurden die Proteine isoliert, aufgetrennt und mit Hilfe der MALDI-TOF-Analyse identifiziert (siehe Abschnitt 2.7).

Durchschnittlich wurden mehr als 1000 Proteinflecken gefunden von denen 118 in unterschiedlichen Mengen vorlagen. Einige Proteine wurden nicht in Gegenwart von LB gefunden während andere nicht in ASM detektiert werden konnten. Bemerkenswert ist die *de novo* Synthese von ca. 72 Proteinen während des Wachstums auf ASM. Die Identifikation mittels MALDI-TOF war nicht immer erfolgreich und häufig konnten mehreren Proteinflecken ein Protein zugeordnet werden, was auf Proteinmodifikationen zurückzuführen ist. Die Ergebnisse des Proteinmustervergleichs nach erfolgreicher Identifikation mittels MALDI-TOF sind in Tab. 12 aufgeführt.

Tab. 12: Ausgewählte Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese und Identifizierung von Proteinen durch MALDI-TOF, die *P. aeruginosa* PAO1 während des anaeroben Stationärphasewachstums in Koloniebiofilmen auf ASM-Agar mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen im Vergleich zu LB-Agar mit 50 mM Nitrat in signifikant unterschiedlichen Mengen gebildet wurden. Teilsweise konnten unterschiedliche Proteinflecken einem Protein zugeordnet werden, was durch in Klammern geschriebene Ziffern angedeutet ist. Dargestellt ist die n-fache Veränderung der Proteinmenge. +2 bedeutet, dass das entsprechende Protein in ASM doppelt so häufig zu finden war im Vergleich zu LB.

Protein	Name	Kategorie oder Klasse	n-fache Regulation
<b>Aminosäuretransport und -abbau</b>			
PA0266	GabT	4-Aminobutyrate-Aminotransferase	nur ASM
PA0430	MetF	5,10-Methylenetetrahydrofolat-Reduktase	nur ASM
PA0895	AruC	Succinylglutamat-5-Semialdehyde-Dehydrogenase	nur ASM
PA4694	IlvC	Ketolsäure-Reduktoisomerase	+ 3,2
PA4759	DapB	Dihydrodipicolinat-Reduktase	nur ASM
PA5171	ArcA	Arginin-Deiminase	nur ASM
PA5173	ArcC	Carbamat-Kinase	nur ASM
<b>Metabolismus</b>			
Denitrifikation			
PA0519	NirS	Nitrit-Reduktase	0,118
PA0520	NirQ	Regulatorisches Protein NirQ	0,245
Pyruvatfermentation			
PA5015	AceE	Pyruvat-Dehydrogenase	+ 2,6
RNA-Abbau			
PA4740	PnP	Polyribonukleotid-Nucleotidyltransferase	+2,2
<b>Antibiotikaresistenz</b>			
PA0958	OprD	Protein D der äußeren Membran	nur LB
PA0432	SahH	S-Adenosylhomocysteine-Hydrolase	nur ASM (1)
PA0432	SahH	S-Adenosylhomocysteine-Hydrolase	+ 54 (2)

Überwiegend konnten während des Wachstums auf ASM Proteine in größeren Mengen gefunden werden, die in den Aminosäuremetabolismus involviert sind. Dazu zählt LpdG, eine Lipoamid-Dehydrogenase. Außerdem konnten unter diesen Bedingungen größere Mengen essentieller Proteine für die Argininfermentation (ArcA, ArcC) identifiziert werden und ein Protein, was möglicherweise an der Pyruvatfermentation (AceE) beteiligt ist, wurde ebenfalls in größeren Mengen vorgefunden. Auch lässt die größere Menge des Proteins Pnp auf einen vermehrten Abbau von Nukleotiden während des Wachstums auf ASM schließen.

Diese Ergebnisse stehen größtenteils in Übereinstimmung mit den Transkriptomdaten und unterstützen somit die Hypothese, dass *P. aeruginosa* während des Wachstums auf ASM durch Metabolisierung von Aminosäuren und Nukleotiden überlebt.

Proteine von Denitrifikationsprozessen sind in größeren Mengen vorhanden, wenn die Zellen auf LB-Agar inkubiert werden. Wie schon unter Abschnitt 3.5.4.1 beschrieben, konnten diese Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Konzentration an Nitrat erwartet werden.

Die größte, neu synthetisierte Proteinmenge in diesen Analysen konnte für PA0432, eine S-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SahH) festgestellt werden, die während des Wachs-



tums auf ASM vermehrt gebildet wird. Dieses Protein ist von besonderem Interesse, da es als pharmakologisches Ziel verwendet wird. Durch Einsatz von Nukleosid-Analoga kann das Enzym gehemmt werden und dadurch Einfluss auf zelluläre Methylierungsprozesse gewonnen werden (Cai *et al.*, 2007; Chiang, 1998; Tanaka *et al.*, 2004). Außerdem könnte eine Beteiligung an Antibiotikaresistenzmechanismen möglich sein (siehe hierzu Abschnitt 3.5.5).

Das OprD-Protein der äußeren Membran wurde in Gegenwart von ASM-Agar nicht produziert. Es ist bekannt, dass der Verlust von OprD in die Antibiotikaresistenz involviert ist. Näheres findet sich unter Abschnitt 3.5.5.

### 3.5.4.3 Metabolomanalyse

Die Metabolite von *P. aeruginosa* wurden in dieser Arbeit per GC-MS in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. D. Schomburg (Institut für Bioinformatik und Biochemie, TU Braunschweig) bestimmt. Dafür wurden vom Wildtyp PAO1 Koloniebiofilme angeimpft (Abschnitt 2.4.4) und anaerob bis zur Stationärphase inkubiert. Die gebildeten Metabolite wurden während des Wachstums auf ASM-Agar mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen und LB-Agar mit 50 mM Nitrat untersucht (siehe Abschnitt 2.8) und miteinander verglichen. Die Daten wurden mit der in Klawonn *et al.* (2007) beschriebenen Statistik ausgewertet. Insgesamt konnten 188 Metabolite identifiziert werden, wovon 74 Metabolite in signifikant unterschiedlichen Mengen vorlagen (Tab. 13). Bezogen auf die, durch die Datenbank Pseudocyc vorhergesagte Anzahl von 678 Metaboliten, entspricht dies einem Anteil von ca. 28 % (Romero & Karp, 2003). Diese Menge liegt im Bereich der zurzeit messbaren Metabolite. So wurden bei GC-MS-Analysen von *Corynebacterium glutamicum* 121 Metabolite und bei Hefen ca. 150 Metabolite identifiziert (Strelkov *et al.*, 2004; Villas-Boas *et al.*, 2005).

Wie die Ergebnisse der Metabolomanalyse in Tab. 13 deutlich zeigen, sind im Vergleich zu LB-Medium bemerkenswert hohe Konzentration von Aminosäuren und Aminosäureabbauprodukten wie Hydroxyprolin, einem Intermediat des Arginin- und Prolinmetabolismus, während des Wachstums auf ASM zu finden. Arginin selbst kann durch die GC-MS-Analyse nicht nachgewiesen werden, da es sehr schnell zerfällt. Vollkommen unerwartet sind hingegen die hohen Konzentrationen von Histidin und Phosphoserin, einer posttranskriptional modifizierten Aminosäure, die auch ein Biosyntheseintermediat von Serin und Cystein ist.

Im Allgemeinen konnten diese Ergebnisse durchaus erwartet werden, da bereits für vergleichbare Wachstumsbedingungen eine Metabolisierung von Aminosäuren als Energiequelle publiziert wurde (Palmer *et al.*, 2007a).

Weiterhin wurden beim Wachstum auf ASM Metabolite gefunden, die während des Abbaus von Nukleotiden produziert werden, z. B. Dihydroorotsäure oder Ribulose-5-Phosphat. Außerdem konnten größere Mengen Laktat, ein Endprodukt der Pyruvatfermentation, identifiziert werden. Allerdings wurde das entsprechende Gen bzw. Protein nicht in vorangegangenen Analysen gefunden, sondern nur die Pyruvat-Dehydrogenase AceE und mögliche Pyruvat-Dehydrogenasegene, die zusammen mit *pta* und *ackA* Acetat bilden würden. Letzteres konnte in den vorliegenden Analysen ebenfalls nicht in größeren Mengen identifiziert werden.

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass PAO1 während des Wachstums auf ASM durch Aminosäure- sowie Nukleotidabbau überleben kann und stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transkriptom- und Proteomanalysen, während eine Beteiligung der Pyruvatfermentation fraglich bleibt.

Im Gegensatz dazu konnten Metabolite des Zuckermetabolismus häufig in größeren Mengen während des Wachstums auf LB-Agar identifiziert werden, während Metabolite des Fettsäuremetabolismus in unterschiedlichen Mengen während der Inkubation auf beiden Medien vorlagen. Fettsäuren werden durch  $\beta$ -Oxidation aus komplexen Lipiden wie Lecithin gebildet. Dafür benötigte Gene wurden während des *in vivo* Wachstums von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge induziert vorgefunden (Kang *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2007). Das Polyamin Spermidin ist in höheren Konzentrationen während des Wachstums auf ASM-Agar vorhanden, welches möglicherweise zur Antibiotikaresistenz unter diesen Bedingungen beiträgt (siehe hierzu Abschnitt 3.5.5).

Tab. 13: Ergebnisse der Metabolomanalyse ausgewählter Metaboliten, die in ASM unterschiedlich reguliert wurden. *P. aeruginosa* PAO1 wurde unter anaeroben Bedingungen in Koloniebiofilmen auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat oder ASM-Agar mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen bis zur entsprechenden Stationärphase inkubiert. Dargestellt ist die relative Zunahme der Stoffmengen. +2 bedeutet, dass das entsprechende Metabolit in ASM in doppelter Menge im Vergleich zu LB vorlag.

Metabolit	Kategorie oder Klasse	Relative Zunahme
<b>Aminosäuremetabolismus</b>		
Histidin	Aminosäure	+ 167,1
Glutamin	Aminosäure	+ 7,0
Alanin	Aminosäure	+ 4,7
Threonin	Aminosäure	+ 3,8
Methionin	Aminosäure	+ 3,4
Glutarat	Aminosäure-Metabolismus	+ 2,6
4-Hydroxyprolin	Arginin/Prolin-Metabolismus	+ 9,7
Pyrrole-2-carboxylat	Arginin/Prolin-Metabolismus	+ 3,9
O-Phosphoserin	Cystein/Serin-Metabolismus	+ 69,7
3-Phosphoglycerat	Glycin/Serin/Threonin-Metabolismus	+ 21,3
3-Methyl-2-oxopentanoat	Isoleucin/Leucin/Isoleucin-Metabolismus	+ 4,0
2,6-Diaminopimelinsäure	Lysin-Metabolismus	+ 36,2
3,4-Dihydroxy-benzoat	Pheylalanin/Tyrosin/Tryptophan-Metabolismus	+ 10,7
4-Hydroxyphenylpyruvat	Thyrosin/Phenylalanin-Metabolismus	+ 19,5
Phenylpyruvat	Thyrosin/Phenylalanin-Metabolismus	+ 18,8
Tryptamin	Tryptophan-Metabolismus	+ 5,9
4-Hydroxyphenylacetat	Tyrosin-Metabolismus	+ 29,4
<b>Nukleotid- und Nukleinsäuremetabolismus</b>		
Uracil	Pyrimidin-Base	+ 14,9
Uridin	Nukleosid	+ 6,5
2-Deoxyribose-5-Phosphat	Ribose-Katabolismus	+ 3,3
Ribulose-5-Phosphat	Ribose-Katabolismus	+ 6,2
Xylulose-5-Phosphat	Ribose-Katabolismus	+ 3,7
Dihydrooorotsäure	Pyrimidin-Metabolismus	+ 51,1
<b>Fettsäuremetabolismus</b>		
Glycerol	Fettsäure-Metabolismus	+ 3,2
Stearinsäure	Fettsäure	+ 2,7
Palmitinsäureamid	Fettsäure-Metabolismus	- 2,7
Laurylsäure	Fettsäure	- 2,8
Glycerinmonooleat	Fettsäure-Metabolismus	- 3,8
Glycerindioleat	Fettsäure-Metabolismus	- 4,5
Ölsäueramid	Fettsäure-Metabolismus	- 8,9
<b>Zuckermetabolismus</b>		
Glukose		- 2,7
Fruktose-6-Phosphat	Pentosephosphat-Weg	- 4,8
Phosphoenolpyruvat	Glykolyse	+ 2,5
Pyruvat	Pyruvatmetabolismus	+ 5,1
Mannitol	Fruktose/Mannose-Metabolismus	+ 14,3
Isomaltose	Zucker und Stärke-Metabolismus	- 4,4
Maltotriose	Zucker-Metabolismus	+ 5,9
Palatinose	Zucker-Metabolismus	+ 5,9
Trehalose	Zucker-Metabolismus	- 14,0
Galaktose	Zucker-Metabolismus	- 31,7
Xylose-1-Phosphat	Zucker-Metabolismus	- 41,8
<b>Andere</b>		
Nicotinat	Kofaktor und Vitamin-Metabolismus	+ 14,8
Nicotinamide	Kofaktor und Vitamin-Metabolismus	- 45,2
Malonat	Carbonsäure, Citrat-Zyklus	- 3,1
Laktat	Carbonsäure, Pyruvatfermentation	+ 2,4
Spermidin	Polyamin	+ 2,5
Putreszin	Polyamin, Spermidin-Vorläufer	- 2,3
1,3-Diaminopropan	Spermidin-Abbau	- 2,8

### 3.5.4.4 Zusammenfassung

Während der Analyse von Transkriptom, Proteom und Metabolom konnten zahlreiche Überschneidungen einzelner metabolischer Pfade identifiziert werden. Anhand der folgenden Beispiele soll dies exemplarisch verdeutlicht werden.

Im ASM sind größere Mengen Mono- und Oligonukleotide vorhanden, die von *P. aeruginosa* metabolisiert werden können. Dabei wird Uridin zu Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) und Uracil abgebaut (Abb. 18). Uracil wird durch das von *ruIC* kodierte Protein in Pseudouridinphosphat umgewandelt. PRPP kann entweder zu Dihydroorotsäure umgewandelt werden oder zu Ribose-1-Phosphat, welches auch Abbauprodukt von Guanin ist, dessen Abbau durch PA0134 katalysiert wird. Im weiteren Verlauf wird Ribose-1-Phosphat zu Ribulose-1-Phosphat und Xylulose-1-Phosphat metabolisiert, wobei letzteres zu Fruktose-1-Phosphat oder über Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 2-Deoxyribose umgewandelt wird. Ribose-1-Phosphat kann auch direkt zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat umgewandelt werden. Während der Metabolomanalyse konnten die in Abb. 18 unterstrichenen Metabolite in signifikanten Mengen identifiziert werden. Bis auf Fruktose-6-Phosphat wurden alle Metabolite in größeren Mengen während des Wachstums auf ASM identifiziert. Auch eingezeichnete Gene (*ruIC*, PA0134), deren Proteine an der Metabolisierung von Nukleotiden beteiligt sind, konnten in den Transkriptomanalysen induziert vorgefunden werden. Somit konnten Parallelen zwischen Metabolom- und Transkriptomanalyse identifiziert werden.

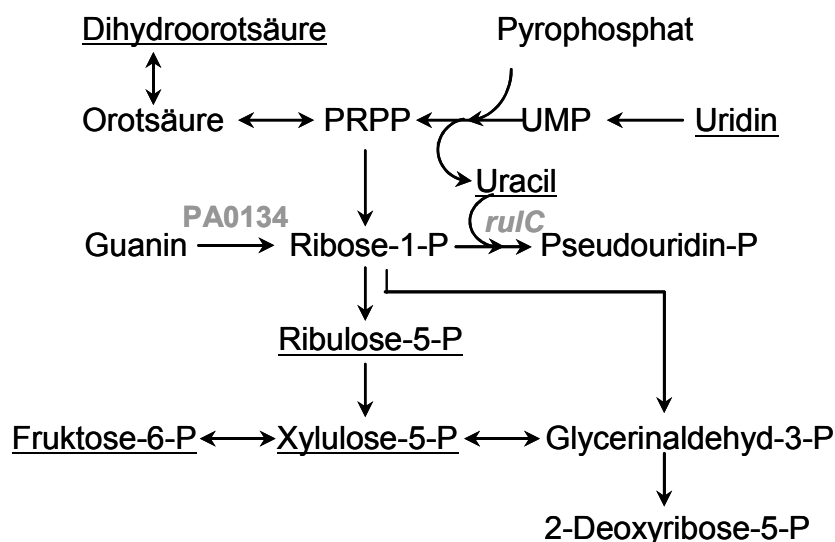


Abb. 18: Schematischer Ausschnitt aus dem Pyrimidinmetabolismus und dem Pentosephosphat-Weg von *P. aeruginosa* PAO1 (zusammengefasst von [www.pseudocyc.com](http://www.pseudocyc.com) und [www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg)). Unterstrichene Komponenten konnten während der Metabolomanalyse in signifikant größeren Mengen während des Wachstums auf ASM gemessen werden mit Ausnahme von Fruktose-6-P, das in geringeren Mengen vorlag. Eingezeichnete Gene (grau) lagen ebenfalls induziert vor. P: Phosphat, PRPP: Phosphoribosylpyrophosphat.

Die Genregulation der Biosynthese und der Degradation von Spermidin lässt sich anhand der Transkriptomanalyse ermitteln. Während der Metabolomanalyse konnten größeren Mengen Spermidin nachgewiesen werden. Dies steht in Übereinstimmung mit den Transkriptomanalysen, die zwar nur eine moderate Induktion von Genen der Spermidinbiosynthese zeigten (*gbuA*, *gpuP*, *speD*, *aguB*, *speE*, *sphH*), aber eine deutliche Repression von Spermidindegradationsgenen (*spuC*, *kauB*). Dabei nimmt das vom Gen *sphH* kodierte Protein eine Sonderrolle ein, da es sowohl Spermin als auch Spermidin abbaut (Dasu *et al.*, 2006). Diese Regulation findet sich anhand unterschiedlicher Metabolitkonzentrationen in den Metabolomanalysen wieder. Während Spermidin in größeren Mengen während des Wachstums auf ASM vorliegt, sind dessen Edukt Putreszin und dessen Abbauprodukt 1,3-Diaminopropan in geringeren Mengen vorhanden.

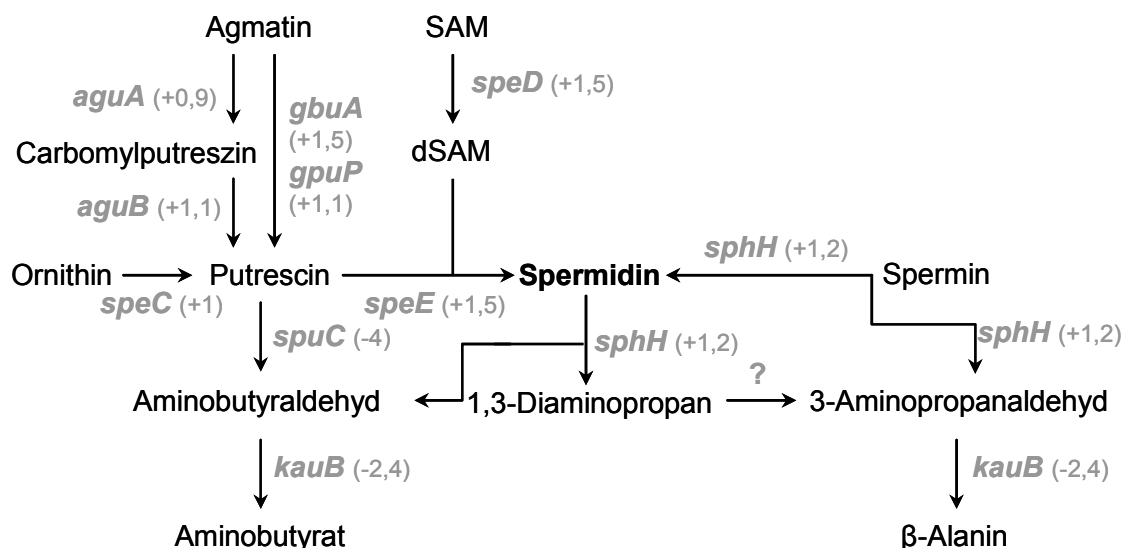


Abb. 19: Schematische Darstellung der Spermidinbiosynthese und Degradation in *P. aeruginosa* PAO1 (zusammengefasst aus Dasu *et al.* (2006), Itoh & Nakada (2004) sowie [www.pseudosys.com](http://www.pseudosys.com)). In den Klammern hinter entsprechenden Genen ist die Regulation zu sehen, die während der Transkriptomanalyse beobachtet wurde. Es ist bis jetzt kein Gen oder Protein bekannt, dass die Reaktion von 1,3-Diaminopropan zu 3-Aminopropanaldehyd katalysiert, was hier durch ein ? gekennzeichnet ist. SAM: S-Adenosylmethionin, dSAM: decarboxyliertes SAM.

Diese Beispiele dokumentieren sehr deutlich das bereits in sich kohärente Bild der einzelnen Analyse-Methoden aber auch die Übereinstimmung zwischen Transkriptom, Proteom und Metabolom. Aufgrund der geringen Anzahl an Proteomdaten konnten leider keine Ergebnisse dieser Analyse in die Beispiele integriert werden.

Zusammenfassend zeigen sowohl Transkriptom-, Proteom- als auch Metabolomanalysen, dass das *P. aeruginosa*-Wachstum während der simulierten Respirationstraktbedingungen auf ASM-Agar unter anaeroben Bedingungen im Vergleich zu LB-Medium wahrscheinlich

auf die Verwendung von Aminosäuren, Nukleotiden und Lecithin sowie auf Fermentationsprozesse zurückzuführen ist.

Während in den Transkriptomanalysen die Gene der Argininfermentation reprimiert sind, finden sich deutliche Mengen an entsprechenden Proteinen in den Proteomanalysen, was auf eine posttranslationale Regulation schließen lässt. Auch die unter Abschnitt 3.2 durchgeführten Wachstumsexperimente mit einer  $\Delta arcDABC$ -Mutante zeigen die Bedeutung der Argininfermentation für das Wachstum in ASM im Gegensatz zu Ergebnissen von Palmer *et al.* (2007b).

Überraschenderweise zählen die Gene von Denitrifikationsprozessen zu den, in den Transkriptomanalysen am stärksten reprimierten Genen und es konnten auch nur geringe Mengen an entsprechenden Proteinen in den Proteomanalysen identifiziert werden. Dies kann zum einen auf die unterschiedlichen Nitratkonzentrationen der beiden Medien zurückgeführt werden und lässt zum anderen eine untergeordnete Rolle der Denitrifikation während des Wachstums unter simulierten Respirationstraktbedingungen vermuten. Allerdings wird der Denitrifikation, insbesondere der Nitrat-Reduktion durch NarG eine essentielle Rolle während des Wachstums im CF-Sputum mit vergleichbaren Nitrat-Konzentrationen zugeschrieben (Palmer *et al.*, 2007b), die eine derartige Genrepression wahrscheinlich nicht erlauben würde. Im Gegensatz dazu konnten die Mutantenstudien unter Abschnitt 3.2 zeigen, dass Energie unter simulierten Respirationstraktbedingungen nicht ausschließlich über Denitrifikationsprozesse gewonnen wird und daher wahrscheinlich nicht essentiell ist.

Das für diese Studien verwendete ASM erlaubt durch Zugabe von physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen eine Simulation des CF-Lungenhabitats, die, im Gegensatz zu anderen bereits beschriebenen Modellen, eine chronischen CF-Infektion am ehesten widerspiegeln kann und damit auch neue Aspekte aufzeigt.

In der Gesamtheit stehen die Ergebnisse größtenteils in Übereinstimmung mit, in der Literatur bereits beschriebenen Möglichkeiten zur Energiegewinnung von *P. aeruginosa* unter respirativen Bedingungen (Kang *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 2007a; Palmer *et al.*, 2007b; Son *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden, die zeigen wie wichtig der Energiemetabolismus für die Virulenz und Antibiotikaresistenz ist.

### 3.5.5 Faktoren für die Antibiotikaresistenz

Im Rahmen der Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalysen wurden unterschiedliche Faktoren identifiziert, die möglicherweise oder schon bekanntermaßen an der Antibiotikaresistenz und -toleranz von *P. aeruginosa* beteiligt sind. Diese sollen im Weiteren erörtert werden.

#### 3.5.5.1 Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase GlpD

In *P. aeruginosa* wird Glycerol in erster Linie über den Entner-Doudoroff-Weg metabolisiert. Intrazelluläres Glycerol wird zu Glycerol-3-Phosphat phosphoryliert und anschließend von der membranassoziierten Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GlpD) zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert, wobei wahrscheinlich ein Elektron auf den Ubiquinon-Pool übertragen wird (Lessie & Phibbs, 1984; Williams *et al.*, 2007). Wie Spoering *et al.* (2006) zeigten, führt in *E. coli* eine *glpD*-Überexpression zur erhöhten Toleranz gegenüber dem  $\beta$ -Laktam Ampicillin und dem Fluorquinolon Ofloxacin. Dieses Phänomen wird auf die Bildung von Persister-Zellen zurückgeführt, wobei der genaue Mechanismus nicht geklärt ist. Dabei handelt es sich um phänotypische Varianten des Wildtyps, die über ein verändertes Expressionsprofil verfügen bei dem Gene für die Energiegewinnung und nicht essentielle Funktionen reprimiert sind. Die Resistenz wird durch die Expression bestimmter Gene, so genannter Toxin-Antitoxin Modulbestandteile vermittelt. Eine *E. coli glpD*-Mutante kann mit dem *P. aeruginosa*-Gen komplementiert werden (Schweizer & Po, 1994). Dies könnte die Vermutung nahe legen, dass auch bei *P. aeruginosa glpD* an einer höheren Antibiotikatoleranz beteiligt sein kann.

#### 3.5.5.2 MexA der MexAB-OprM Effluxpumpe

Die MexAB-OprM Effluxpumpe besteht aus drei Proteinen, der cytoplasmatischen, energieabhängigen Pumpe MexB, dem Linkerprotein MexA und der Membrankomponente OprM der äußeren Membran. Eine Vielzahl von Substanzen werden durch diese Pumpe exportiert, darunter auch Antibiotika unterschiedlichster Gruppen, wie  $\beta$ -Laktame, Fluorquinolone, Tetracycline und Makrolide (Schweizer, 2003). Die Überproduktion von Effluxpumpen gehört zu den häufigsten Resistenzmechanismen von klinischen *P. aeruginosa*-Isolaten (Henrichfreise *et al.*, 2007).

### 3.5.5.3 S-Adenosylhomocystein-Hydrolase SahH

Vollkommen unerwartet konnten während der Proteomanalyse große Mengen des Proteins SahH identifiziert werden. Dieses Enzym hydrolysiert S-Adenosylhomocystein zu Homocystein und Adenosin. Das Edukt S-Adenosylhomocystein unterbindet durch Produktinhibition die Reaktion von S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängigen Methyltransferasen, die hauptsächlich für Methylierungen in der Zelle verantwortlich sind. Somit spielt SahH indirekt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Methylierungsreaktionen von DNA, RNA, Phospholipiden, Proteinen und kleinen Molekülen (Chiang, 1998).

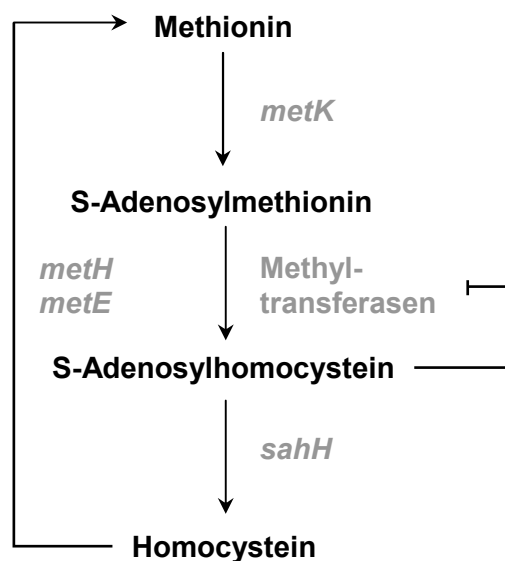


Abb. 20 Schematische Darstellung eines Teils der Methionin-Biosynthese von *P. aeruginosa* PAO1.

Die Rolle von SahH in der Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* während des Wachstums auf ASM ist ungeklärt. Durch die indirekte Regulation von Methylierungen könnten sich Auswirkungen auf die Antibiotikaresistenz ergeben. Für *E. coli* und *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass SAM-abhängige Methylierungen an der Position A1408 der 16S rRNA in der 30S Untereinheit der Ribosomen für eine erhöhte Aminoglykosid-Resistenz verantwortlich sind (Wachino *et al.*, 2007; Yokoyama *et al.*, 2003). Allerdings wurde dies bis jetzt nur für plasmidkodierte Methyltransferasen beschrieben. Außerdem haben Methyltransferasen von *E. coli* einen entscheidenden Einfluss auf die Virulenz während einer Harnwegsinfektion (Low *et al.*, 2001). Da die hohen Proteinkonzentrationen der Proteomanalyse im Gegensatz zu den Ergebnissen der Transkriptomanalyse stehen, kann von einer posttranslationalen Regulation ausgegangen werden.

### SahH ist eine bekannte Zielstruktur für Virostatika

Das SahH-Protein ist phylogenetisch sehr konserviert und zeigt hohe Sequenzhomologie zwischen Pflanzen, Tieren, Protozoen und Bakterien (Lozada-Ramirez *et al.*, 2008). Dennoch ist das Enzym von besonderem Interesse, da es als pharmakologisches Ziel zur Bekämpfung einer Vielzahl von Krankheiten, wie Hypercholesterinämie, Malaria und Krebs dient (Bujnicki *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2004; Yaginuma *et al.*, 1981; Yamada *et al.*, 2007). Es konnte eine hemmende Wirkung auf das SahH-Protein von *Trypanosoma cruzi* durch das Virostatikum Ribavirin gezeigt werden (Cai *et al.*, 2007). Das Guanosin-



Analogon Ribavirin kommt bei unterschiedlichen Viruserkrankungen zum Einsatz. In der menschlichen Zelle wird Ribavirin durch zelleigene Enzyme phosphoryliert und kann anschließend auf die Virusreplikation durch, bis jetzt nur postulierte Mechanismen wirken. So soll es zur verminderten Bildung von Guanosinnukleotiden kommen und die virale RNA-Polymerase gehemmt werden, was eine unterdrückte Virusreplikation zur Folge hat (Jordan *et al.*, 2000). Von besonderer Bedeutung ist Ribavirin bei der Behandlung der chronischen Hepatitis C in Kombination mit Interferonen (Davis *et al.*, 1998).

Die MIC von Ribavirin wurde für *P. aeruginosa* PAO1 (Abschnitt 2.4.6) mit 2 mg/ml bestimmt und steht in Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen (Kruszewska *et al.*, 2002). Die Wirkung von Ribavirin auf das anaerobe Stationärphase-Biofilmwachstum von PAO1 auf ASM-Agar wurde untersucht, da unter diesen Bedingungen große Proteinmengen von SahH identifiziert wurden (siehe Abschnitt 3.5.4.2). Dazu wurden PAO1 Koloniebiofilme wie unter Abschnitt 2.4.4 beschrieben beimpft und anaerob auf ASM-Agar mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen für sechs Tage inkubiert. Anschließend wurden die Filter auf ASM-Agar mit 2 mg/ml Ribavirin transferiert und für 12 h inkubiert. Die Lebendzellzahl wurden bestimmt (Abschnitt 2.4.3) und die Überlebensrate im Vergleich zu unbehandelten Zellen berechnet.

Es konnte eine Überlebensrate von lediglich 30 % ( $\pm 11,3$  %) im Vergleich zu unbehandelten Biofilmen bestimmt werden. Diese Ergebnisse dokumentieren eindeutig die Wirksamkeit des Virostatikums, welches unter diesen Bedingungen im Bereich des Antibiotikums Carbenicillin liegt (siehe Abschnitt 3.5.3). Eine klinische Studie zur Wirksamkeit des Virostatikum gegen chronische *P. aeruginosa*-Lungeninfektionen von CF-Patienten könnte daher in Betracht gezogen werden.

#### 3.5.5.4 OprD-Protein der äußeren Membran

Bei OprD von *P. aeruginosa* handelt es sich um ein substratspezifisches, tunnelbildendes Protein der äußeren Membran, dessen aus 18  $\beta$ -Faltblättern gebildete, fassförmige, monomere Struktur im Jahr 2007 gelöst wurde (Biswas *et al.*, 2007). Das Protein ermöglicht die Aufnahme von basischen Aminosäuren sowie den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika Imipenem und Meropenem (Huang & Hancock, 1993; Ochs *et al.*, 1999).

Die Rolle von OprD in der Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* ist seit längerem bekannt (Lynch *et al.*, 1987). Durch eine Deletion im kodierenden Bereich von *oprD* sowie in der Promoterregion geht die Proteinfunktion verloren (Yoneyama & Nakae, 1993). Daraus resultiert eine Resistenz gegenüber Imipenem und eine geringere Anfälligkeit gegen-

über Meropenem. Dieser Resistenzmechanismus ist häufig bei klinischen *P. aeruginosa* Isolaten zu finden (Henrichfreise *et al.*, 2007) und konnte auch in vorliegenden Transkriptom- und Proteomanalysen beobachtet werden.

OprD wird in *P. aeruginosa* negativ durch MexT reguliert. Dabei induziert MexT gleichzeitig die Gene der MexEF-OprN Effluxpumpe (Ochs *et al.*, 1999). In den vorliegenden Transkriptomanalysen ist eine erhöhte, wenn auch nicht signifikante, Induktion der Gene *mexE* (+1,5), *mexF* (+1,3) und *oprN* (+1,1) zu beobachten (Tab. 15 im Anhang). Dieses legt die Vermutung nahe, dass während des Wachstums auf ASM eine Repression von *oprD* durch MexT stattfinden könnte.

### 3.5.5.5 Spermidin

Für Spermidin konnte bereits ein Einfluss auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* gezeigt werden, wobei der genaue Mechanismus bis jetzt unbekannt ist. Spermidin gehört zur Gruppe der Polyamine. Diese Moleküle sind essentiell und können in allen lebenden Zellen gefunden werden. Durch ihren kationischen Charakter sind sie größtenteils mit azidischen Makromolekülen verbunden, wie genomischer DNA und rRNA (Kwon & Lu, 2007). Wird *P. aeruginosa*-Kulturen exogenes Spermidin hinzugefügt, verändert sich die Antibiotikaresistenz der Zellen. So ist eine Zunahme der MIC gegenüber antibiotischen kationischen Peptiden, Aminoglykosiden und Quinolonen zu beobachten (Kwon & Lu, 2006a). Sie wird auf den expressionsinduzierenden Effekt von Spermidin auf das *oprH-phoPQ*-Operon und das *arnBCADTEF*-Operon zurückgeführt. Beide Operons sind an Resistenzmechanismen für Polymyxin B und antibiotischen kationischen Peptiden beteiligt (Gooderham & Hancock, 2009; Macfarlane *et al.*, 1999; Macfarlane *et al.*, 2000). Außerdem soll *phoP* eine Resistenz gegenüber Quinolonen vermitteln (Kwon & Lu, 2006a). Der induzierende Effekt auf die Transkription konnte zwar in vorliegenden Transkriptionsdaten beobachtet werden, jedoch ist die Induktion nicht signifikant (siehe hierzu Tab. 14 im Anhang).

Im Gegensatz dazu sinken die MICs gegenüber  $\beta$ -Laktamen und Chloramphenicol bei Zugabe von Spermidin (Kwon & Lu, 2006b). Für *E. coli* wurde gezeigt, dass Polyamine die OmpF und OmpC Porine in der äußeren Membran blockieren. Durch diese Porine gelangen  $\beta$ -Laktame in die Zelle. Ein Verschluss der Porine geht mit einer erhöhten Resistenz gegenüber entsprechenden Antibiotika einher (Dela Vega & Delcour, 1996).

Spermidin wird in *P. aeruginosa* durch die Spermidin-Synthase SpeE bereitgestellt. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Putreszin unter Dekarboxylierung des Aminoropyldo-

nors S-Adenosylmethionine zu Spermidin. Dabei wird 5'-S-Methyl-5'-thioadenosin gebildet (www.expasy.ch). Neben den größeren Mengen Spermidin während der Metabolomanalyse konnte eine induzierte Expression des *speE*-Gens in den Transkriptomanalysen beobachtet werden (Tab. 11).

### 3.5.6 Mutanten-Studien

Basierend auf den Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalysen wurden insgesamt fünf Faktoren identifiziert, die möglicherweise einen Einfluss auf die Antibiotikaresistenz haben. Diese These sollte durch Herstellung von Deletionsmutanten untersucht werden.

Dazu wurden unmarkierte Deletionsmutanten von *glpD*, *sahH* und *speE* erstellt. Die Wahl fiel im Zusammenhang mit dem, während der Transkriptionsanalyse induzierten, Gen *mexA* auf das der MexAB-OprM Effluxpumpe zugehörige Membranprotein OprM, da möglicherweise die MexAB-OprM Effluxpumpe auch ohne das Linkerprotein MexA aktiv ist (Schweizer, 2003). Daher wurde eine  $\Delta oprM$ -Mutante erstellt. Die Deletion von *oprM* führt sowohl zum Ausfall der MexAB-OprM als auch der MexXY-OprM Effluxpumpe.

Des Weiteren wurden  $\Delta glpD\Delta sahH$ - und  $\Delta sahH\Delta speE$ -Doppelmutanten sowie eine  $\Delta glpD\Delta sahH\Delta speE$ -Dreifachmutante wie unter Abschnitt 2.5.11.2 und 2.5.12 beschrieben, erzeugt. Die Herstellung einer  $\Delta oprD$ -Mutante war nicht möglich und das Erstellen einer Vierfachmutante war nicht durchführbar, da die im Genom verbleibenden FRT-Sequenzen dieses verhinderten. Die Gene *oprM* (PA0427) und *sahH* (PA0432) liegen lediglich 4,9 kb voneinander entfernt. Die zurückbleibende FRT-Sequenz bei einer Gendeletion wird von der FLP-Rekombinase beim Versuch *oprM* und *sahH* zu deletieren erkannt. Dadurch werden die vier dazwischen liegenden Gene ebenfalls herausgeschnitten, was eine eindeutige Zuordnung einer möglichen Antibiotikaresistenz zu einem Gen unmöglich macht.

#### 3.5.6.1 Wachstum von Mutanten auf ASM-Agar

Zunächst wurden die Wachstumsphänotypen der verschiedenen Mutanten überprüft. Dazu wurden wie unter Abschnitt 2.4.4 beschrieben Koloniebiofilme beimpft und unter anaeroben Bedingungen auf ASM-Agar mit physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen bei 37 °C inkubiert. Wie in Abb. 21 zu sehen, zeigen die Mutanten  $\Delta glpD$ ,  $\Delta speE$  und  $\Delta oprM$  das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp PAO1. Im Gegensatz dazu wachsen die Mutanten mit einer Deletion des *sahH*-Gens wesentlich langsamer, wie die Wachstumskurven der  $\Delta sahH$ -Mutante sowie der entsprechenden Doppel- und der Dreifachmutante sehr deutlich erkennen lassen. Der Grund für das langsame Wachstum bei einer Deletion

von *sahH* ist nicht bekannt und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eingehender untersucht werden. Eine *sahH*-Deletionsmutante von *Rhodobacter capsulatus* zeigt längere Generationszeiten im Vergleich zum Wildtyp bei einer Inkubation in Minimalmedium mit Homocystein oder Methionin, wohingegen in Vollnährmedium kein Unterschied zu beobachten ist (Sganga *et al.*, 1992). Nach einer Inkubationszeit von sechs Tagen erreicht sowohl der Wildtyp PAO1 als auch alle Mutanten die Stationärphase.

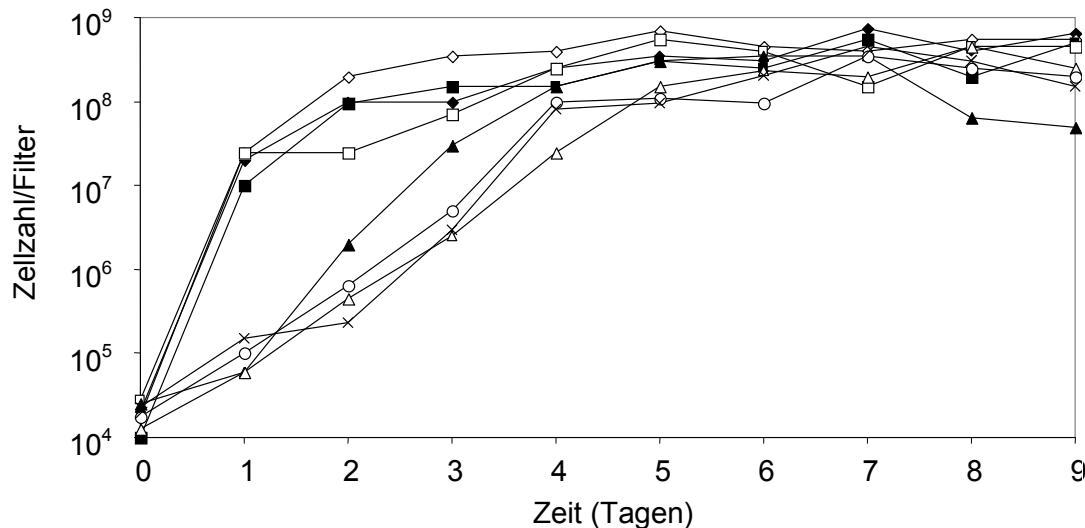


Abb. 21: Wachstumskurven von Koloniebiofilmen unterschiedlicher *P. aeruginosa* Deletionsmutanten und dem korrespondierenden Wildtyp PAO1 auf ASM-Agar mit physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen. Ausgefüllte Raute: Wildtyp PAO1, leere Raute:  $\Delta glpD$ , ausgefülltes Viereck:  $\Delta oprM$ , leeres Viereck:  $\Delta speE$ , ausgefülltes Dreieck:  $\Delta sahH$ , leeres Dreieck:  $\Delta glpD\Delta sahH$ , leerer Kreis:  $\Delta sahH\Delta speE$ , Kreuz:  $\Delta glpD\Delta sahH\Delta speE$ . Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. Dargestellt ist die Zellzahl pro Filter über einen Zeitraum von 9 Tagen.

### 3.5.6.2 Antibiotikaresistenz von Mutanten während der Stationärphase

Bereits während der Herstellung der Mutanten konnte festgestellt werden, dass die MIC von bestimmten Mutanten gegenüber Gentamicin und Carbenicillin, die während der Mutagenese eine entscheidende Rolle spielten, sank (Daten nicht gezeigt).

Um die Antibiotikaresistenz verschiedener Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen, wurden diese in Form von Koloniebiofilmen (Abschnitt 2.4.4) unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C bis zur Stationärphase inkubiert. Wie in Abb. 21 zu sehen, erreichten alle Mutanten nach sechs Tagen die Stationärphase. Nach einer anschließenden 12-stündigen Inkubation mit der 10-fachen MIC von Tobramycin oder Ciprofloxacin wurde die Lebendzellzahl (Abschnitt 2.4.3) bestimmt und die Überlebensrate im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. Die Überlebensrate des Wildtyp PAO1 wurde gleich 100 % gesetzt und darauf basierend mit den Überlebensraten der Mutanten verglichen (siehe Abb. 22).

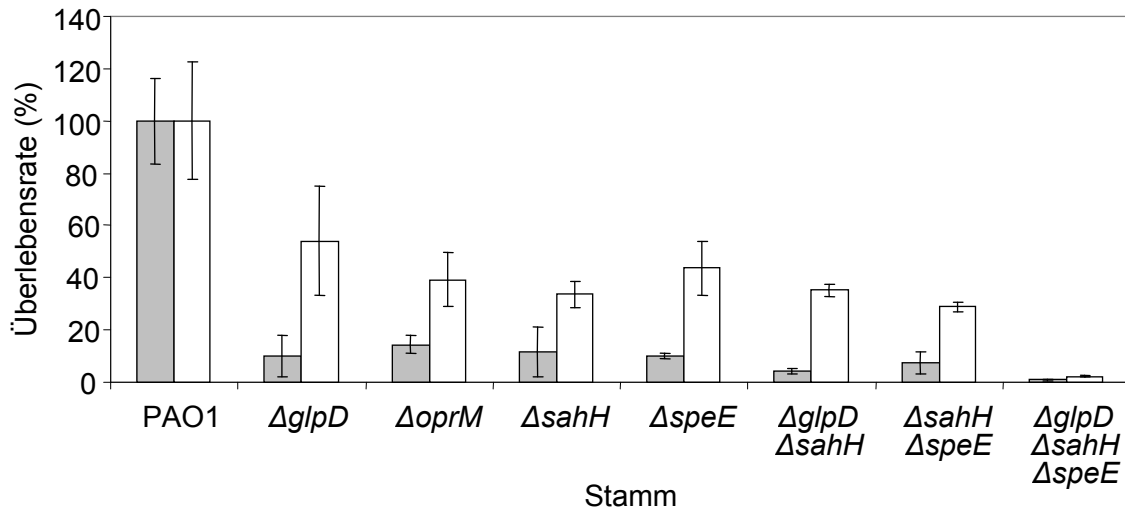


Abb. 22: Überlebensrate in Prozent vom Wildtyp PAO1 und entsprechenden Deletionsmutanten in Koloniebiofilmen, die bis zur Stationärphase auf ASM-Agar mit physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen inkubiert wurden und anschließend für 12 h der 10-fachen MIC von Tobramycin (graue Balken) oder Ciprofloxacin (weiße Balken) ausgesetzt wurden. Die Überlebensrate von PAO1 wurde gleich 100% gesetzt und die Überlebensraten der entsprechenden Mutanten wurden basierend auf der Überlebensrate von PAO1 berechnet.

Wie in Abb. 22 zu sehen, ist die Antibiotikaresistenz jeder einzelnen Mutante gegenüber dem Aminoglykosid Tobramycin (graue Balken) und dem Fluorquinolon Ciprofloxacin (weiße Balken) deutlich geringer im Vergleich zum Wildtyp PAO1.

Bei einer Deletion von *glpD* konnte nur eine Überlebensrate von 54 % nach der Behandlung mit Ciprofloxacin im Vergleich zu PAO1 beobachtet werden. Diese höhere Anfälligkeit der  $\Delta glpD$ -Mutante gegenüber Quinolonen konnte vermutet werden, da eine *E. coli*  $\Delta glpD$ -Mutante ebenfalls dieses Phänomen zeigt (Spoering *et al.*, 2006). Völlig unerwartet ist hingegen die geringere Resistenz gegenüber Tobramycin, wobei nur 10 % der Zellen die Behandlung im Vergleich zum Wildtyp PAO1 überleben.

Die Sensitivität der  $\Delta oprM$ -Mutante gegenüber Ciprofloxacin (39 % Überlebensrate verglichen zu PAO1) entspricht den Erwartungen, da die MexAB-OprM Effluxpumpe Fluorquinolone exportiert. Dieses Phänomen wurde bereits für eine  $\Delta oprM$ -Mutante publiziert bei der eine Überlebensrate von 5 % im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden konnte (Li *et al.*, 1995; Yoneyama *et al.*, 1997). Aufgrund unterschiedlicher Bedingungen ist diese Überlebensrate nicht unbedingt vergleichbar. Da OprM auch die Membrankomponente der Aminoglykosid-transportierenden MexXY-OprM Effluxpumpe ist, konnte die geringere Resistenz gegenüber Tobramycin (14 %) ebenso erwartet werden (Schweizer, 2003).

Auch die geringe Resistenz der  $\Delta speE$ -Mutante gegenüber Tobramycin (10 % Überlebensrate im Vergleich zu PAO1) und Ciprofloxacin (44 %) war anzunehmen, da bekannt ist,

dass Spermidin eine Resistenz gegenüber Quinolonen und Aminoglykosiden vermittelt (Kwon & Lu, 2006a).

Bei einer Deletion von *sahH* können Überlebensraten von 12 % (Tobramycin) und 34 % (Ciprofloxacin) im Vergleich zu PAO1 beobachtet werden. Die Ergebnisse dokumentieren eindeutig die wichtige Rolle des Enzyms für die Antibiotikaresistenz in *P. aeruginosa*, wobei der Mechanismus unklar bleibt. Wahrscheinlich kommt es zur Akkumulation von S-Adenosylhomocystein, was eine Hemmung der S-Adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferasen bedingt. Durch die regulatorischen Funktionen von Methylierungen auf unterschiedlichen Ebenen kommt es möglicherweise auch zu Auswirkungen auf Antibiotikaresistenzmechanismen.

Des Weiteren zeigen die Doppel- und Dreifachmutanten eine weit niedrigere Resistenz gegenüber den Antibiotika verglichen zum Wildtyp und den Einzelmутanten. Für die Dreifachmutante zeigt sich nur eine Überlebensrate von 2 % nach der Behandlung mit Ciprofloxacin oder 0,97 % für Tobramycin.

Diese Ergebnisse dokumentieren eindeutig, dass jeder identifizierte Faktor an der Antibiotikaresistenz von PAO1 unter diesen simulierten Respirationstraktbedingungen beteiligt ist. Da es nicht möglich war eine Vierfachmutante zu erstellen und die Deletion von OprD zu untersuchen, kann nicht eindeutig geklärt werden, ob nur die identifizierten Faktoren oder noch weitere Komponenten für die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* während des Wachstums auf ASM beteiligt sind. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die hohe Antibiotikaresistenz auf mindestens vier unterschiedliche Faktoren zurückzuführen ist.

Ein Vergleich der hier identifizierten Resistenzfaktoren mit den Ergebnissen aus Abb. 15 kann größtenteils die beobachteten Resistenzen gegenüber den unterschiedlichen Antibiotika erklären. So ist allein die MexAB-OprM Effluxpumpe sowie die, durch die Deletion von *oprM* außer Funktion gesetzte MexXY-OprM Effluxpumpe für eine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamen, Quinolonen und Aminoglykosiden verantwortlich (Schweizer, 2003). Weiterhin wird eine Resistenz gegenüber Quinolonen und Aminoglykosiden durch Spermidin vermittelt (Kwon & Lu, 2006a) und wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, trägt auch GlpD und SahH zu der Resistenz bei. Allerdings lässt sich mit keinen der identifizierten Faktoren die beobachtete Resistenz gegenüber Rifampicin erklären. Bis jetzt sind nur plasmidvermittelte Rifampicinresistenzen bei *Pseudomonas fluorescens* sowie eine integronvermittelte Resistenz bei einem klinischen *P. aeruginosa* Isolat bekannt

(Chandrasekaran & Lalithakumari, 1998; Tribuddharat & Fennwald, 1999). In *E. coli* kommt es zu spontanen Resistenzen gegenüber Rifampicin durch diverse Mutation im *rpoB*-Gen, welches für die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert (Jin & Gross, 1988). Dies erklärt wahrscheinlich nicht die hier beobachtete Resistenz und könnte ein Zeichen für einen neuen, bis jetzt unbekannten Mechanismus der Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* sein. Allerdings ist die hohe Antibiotikaresistenz gegenüber Rifampicin kritisch zu betrachten, da im Gegensatz zu anderen getesteten Antibiotika nur die einfache MIC für die Untersuchungen verwendet wurde und somit eine höhere Resistenz zu erwarten war.

### 3.5.6.3 Antibiotikaresistenz von Mutanten in Abhängigkeit von der Nitrat-Konzentration

Bei der Herstellung der getesteten *P. aeruginosa*-Deletionsmutanten wurden molekularbiologische Methoden eingesetzt, bei denen die erfolgreich modifizierten Stämme mit Antibiotika, wie z. B. Carbenicillin und Gentamicin selektiert wurden (siehe Abschnitt 2.5.11.2). Arbeiten in unserem Labor haben gezeigt, dass im Rahmen dieser Modifikation auch die Antibiotikaresistenz beeinflusst werden kann, z. B. durch die Induktion von Effluxpumpen. Um zu überprüfen, ob das hier eingesetzte Mutageneseverfahren einen Einfluss auf die Antibiotikaresistenz hat, wurde der Wildtyp PAO1, die Dreifachmutante  $\Delta glpD\Delta sahH\Delta speE$  (ST58) und eine weitere Dreifachmutante (NB94) auf ASM-Agar getestet. Bei der Mutante NB94 wurden drei universelle Stressproteine ausgeschaltet (PA3309, PA4353, PA1789), deren Deletion aber keine Auswirkungen unter simulierten Respirationstraktbedingungen haben (Daten nicht gezeigt).

Allerdings wurde die Antibiotikaresistenz nicht nur unter physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen überprüft, sondern auch auf ASM-Agar ohne bzw. mit 700  $\mu\text{M}$  Nitrat. Das Ziel dieser Untersuchungen war es, den Einfluss der Deletion bei unterschiedlichen Nitrat-Konzentrationen zu überprüfen um daraus schließen zu können, ob die beobachtete Sensitivität gegenüber Antibiotika nur während der Inkubation auf physiologischen  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen zu beobachten oder auch auf andere Nitrat-Konzentrationen übertragbar ist.

Dafür wurden Koloniebiofilm wie unter Abschnitt 2.4.4 beschrieben beimpft und für 24 h anaerob inkubiert. Anschließend erfolgte eine 12-stündige Inkubation auf ASM-Agar unterschiedlicher Nitratkonzentration, wobei teilweise die 10-fache MIC von Tobramycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Ciprofloxacin (6  $\mu\text{g/ml}$ ) zugeben wurde. Dann erfolgte die Bestimmung

der Lebendzellzahl und die Überlebensrate wurde im Vergleich zu unbehandelten Biofilmen ermittelt. Die Überlebensrate des Wildtyp PAO1 wurde gleich 100 % gesetzt und darauf basierend mit den Überlebensraten der Mutanten verglichen.

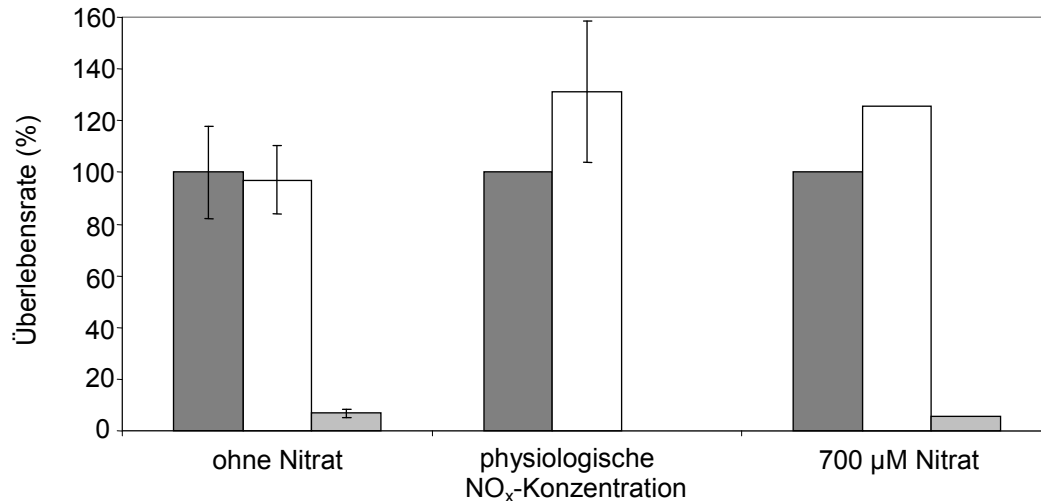


Abb. 23: Überlebensrate in Prozent vom *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 (dunkles grau) und den entsprechenden Mutanten NB94 (weiß) sowie ST58 (helles grau) in Koloniebiofilmen, die 24 h auf ASM-Agar mit unterschiedlichen Nitrat-Konzentrationen inkubiert wurden und anschließend für 12 h der 10-fachen MIC von Tobramycin ausgesetzt wurden. Die Überlebensrate von PAO1 wurde gleich 100% gesetzt und die Überlebensraten der Mutanten wurden basierend auf der Überlebensrate von PAO1 berechnet.

Wie in Abb. 23 zu sehen, zeigt der Wildtyp während der Inkubation auf ASM mit oder ohne Nitrat in etwa die gleiche Antibiotikaresistenz wie die Dreifachmutante NB94. Damit kann ein Einfluss der Deletionsprozedur auf die Antibiotikaresistenz ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu sind nur geringe oder keine Überlebensraten von ST58 zu beobachten. Bei der Inkubation ohne Nitrat überleben 6 % der Zellen, während bei physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen kein Überleben zu beobachten ist und eine Inkubation mit 700 µM Nitrat eine Überlebensrate von 7 % im Vergleich zu PAO1 zeigt. Die Antibiotikaresistenz ohne Nitrat bzw. mit 700 µM Nitrat nimmt beim Stamm ST58 wieder zu, während sich beim Wildtyp und NB94 keine Veränderung zeigen.

Diese Ergebnisse dokumentieren eindeutig, dass die identifizierten und in ST58 ausgeschalteten Gene die größte Auswirkung auf die Antibiotikaresistenz während der Inkubation auf physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen haben. Aber auch bei anderen Nitrat-Konzentrationen ist dieses Phänomen zu beobachten, auch wenn die Auswirkungen etwas geringer sind. Dies deutet darauf hin, dass die auf ASM mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen identifizierten Faktoren wichtig für die Resistenz gegenüber Antibiotika sind.



## 4 Zusammenfassung und Ausblick

### 4.1 Zusammenfassung

Die hohe Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* während chronischen, CF-assozierten Lungeninfektionen führt zu hohen Mortalitätsraten der Patienten. Zur Ursachenbestimmung wurde das artifizielle Sputum-Medium (ASM) zur Simulation der CF-Respirationstraktbedingungen verwendet. Der Wildtyp PAO1 bildete in ASM biofilmähnliche Mikrokolonien, den charakteristischen *P. aeruginosa*-Wachstumsphänotyp für die Besiedelung der CF-Lunge. Es konnte gezeigt werden, dass die Antibiotikaresistenz von PAO1 während der anaeroben Inkubation mit ASM in Koloniebiofilmen bei unterschiedlichen Nitrat-Konzentrationen variiert. Dabei zeigte sich die höchste Resistenz bei Verwendung der durchschnittlichen physiologischen Nitrat- und Nitrit-Konzentration der CF-Lunge.

Mittels Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalyse und Mutantenstudien konnte gezeigt werden, dass PAO1 während der Inkubation auf ASM durch Denitrifikation, Arginin- sowie Pyruvatfermentation, Metabolisierung von Nukleotiden, Lecithin und Aminosäuren Energie gewinnt. Dabei wurden Faktoren identifiziert, die an einer Antibiotikaresistenz beteiligt sind. Dazu gehören eine Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase GlpD, die S-Adenosylhomocystein-Hydrolase SahH, das Protein der äußeren Membran OprD, das Polyamin Spermidin und die MexAB-OprM Effluxpumpe. Nach der Deletion von Genen, die für die Synthese entsprechender Faktoren essentiell sind, wurde die Antibiotikaresistenz dieser Mutanten im Vergleich zu PAO1 untersucht. Es ließ sich ein additiver Effekt auf die Antibiotikasensitivität bei Mehrfachmutanten beobachten. Die identifizierten Faktoren sind nicht allein für die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* unter simulierten Respirationstraktbedingungen verantwortlich, sondern weitere unbekannte Faktoren sind involviert. Dies konnte durch Veränderungen der Antibiotikaresistenz während der Inkubation mit unterschiedlichen Nitratkonzentrationen gezeigt werden.

Die bislang vertretene Meinung, dass langsames Wachstum und die damit einhergehende geringe metabolische Aktivität der Zellen für eine erhöhte Antibiotikaresistenz verantwortlich sind, stimmt daher nicht.

In ihrer Gesamtheit belegen die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen, dass der Energiemetabolismus ein entscheidender Faktor für die Virulenz und Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* unter simulierten Respirationstraktbedingungen ist.

## 4.2 Ausblick

Es scheint angemessen eine standardisierte Antibiotikatestmethode zu entwickeln um eine bestmögliche Therapie von CF-assoziierten Lungeninfektionen zu ermöglichen. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass es dabei unabdingbar ist die Wachstumsbedingungen im CF-Lungenmilieu zu beachten. Natürlich ist zu berücksichtigen, dass z. B. chronische *P. aeruginosa*-Infektion oft mehrere Jahrzehnte dauern und meist von einem einzigen Klon ausgelöst werden, der sich durch Mutation an die Wachstums- und Stressbedingungen der CF-Lunge angepasst hat. Allerdings kann mit Hilfe von ASM die Wirksamkeit von bereits bekannten Antibiotika und unbekannten Substanzen besser unter CF-ähnlichen Bedingungen getestet werden, was auch eine erfolgreichere Therapie von CF-assoziierten Lungeninfektionen verspricht.

Durch die gewonnenen Informationen aus den Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalysen sind neue Ziele für eine Antibiotikatherapie aufgezeigt worden. Möglicherweise können somit neue Ansätze für eine Therapie von *P. aeruginosa*-Infektionen gefunden werden, wie bereits die hier beschriebenen Untersuchungen mit dem Virostatikum Ribavirin zeigen.

Auch die Rolle von Methionin in der Pathogenese von *P. aeruginosa* sollte genauer untersucht werden. Vorliegende Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Methioninauxotrophie nicht nur den Vorteil des geringen Energieaufwandes aufgrund der fehlenden Methioninbiosynthesereaktionen in sich birgt, sondern auch eine Querverbindung zum *quorum sensing* zu finden ist.

## 5 Literaturverzeichnis

- Aaron, S. D., Ferris, W., Ramotar, K., Vandemheen, K., Chan, F. & Saginur, R. (2002).** Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **40**, 4172-4179.
- Ahmed, A. (1973).** Mechanism of repression of methionine biosynthesis in *Escherichia coli*. I. The role of methionine, s-adenosylmethionine, and methionyl-transfer ribonucleic acid in repression. *Mol Gen Genet* **123**, 299-324.
- Akasaka, T., Tanaka, M., Yamaguchi, A. & Sato, K. (2001).** Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2263-2268.
- Alaminos, M. & Ramos, J. L. (2001).** The methionine biosynthetic pathway from homoserine in *Pseudomonas putida* involves the metW, metX, metZ, metH and metE gene products. *Arch Microbiol* **176**, 151-154.
- Alvarez-Ortega, C. & Harwood, C. S. (2007).** Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Mol Microbiol* **65**, 153-165.
- Anderl, J. N., Franklin, M. J. & Stewart, P. S. (2000).** Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1818-1824.
- Anwar, H., Dasgupta, M., Lam, K. & Costerton, J. W. (1989).** Tobramycin resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm grown under iron limitation. *J Antimicrob Chemother* **24**, 647-655.
- Arai, H., Sanbongi, Y., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1990).** Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome c-551 from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **261**, 196-198.
- Arai, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1995a).** The structural genes for nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* **1261**, 279-284.
- Arai, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1995b).** Expression of the nir and nor genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEBS Lett* **371**, 73-76.
- Arai, H., Mizutani, M. & Igarashi, Y. (2003).** Transcriptional regulation of the nos genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**, 29-36.
- Arvidsson, R. H., Nordling, M. & Lundberg, L. G. (1989).** The azurin gene from *Pseudomonas aeruginosa*. Cloning and characterization. *Eur J Biochem* **179**, 195-200.

**Barth, A. L. & Pitt, T. L. (1995).** Auxotrophic variants of *Pseudomonas aeruginosa* are selected from prototrophic wild-type strains in respiratory infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **33**, 37-40.

**Barth, A. L. & Pitt, T. L. (1996).** The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* **45**, 110-119.

**Barth, A. L., Woodford, N. & Pitt, T. L. (1998).** Complementation of methionine auxotrophs of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis. *Curr Microbiol* **36**, 190-195.

**Bielecki, P. (2009).** Persönliche Mitteilung. HZI Braunschweig, Braunschweig.

**Biswas, S., Mohammad, M. M., Patel, D. R., Movileanu, L. & van den Berg, B. (2007).** Structural insight into OprD substrate specificity. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1108-1109.

**Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M. & Speed, T. P. (2003).** A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185-193.

**Borriello, G., Werner, E., Roe, F., Kim, A. M., Ehrlich, G. D. & Stewart, P. S. (2004).** Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2659-2664.

**Boulette, M. L., Baynham, P. J., Jorth, P. A., Kukavica-Ibrulj, I., Longoria, A., Barrera, K., Levesque, R. C. & Whiteley, M. (2009).** Characterization of alanine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and its importance for proliferation in vivo. *J Bacteriol* **191**, 6329-6334.

**Bragonzi, A., Worlitzsch, D., Pier, G. B. & other authors (2005).** Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J Infect Dis* **192**, 410-419.

**Bragonzi, A., Wiehlmann, L., Klockgether, J., Cramer, N., Worlitzsch, D., Doring, G. & Tummler, B. (2006).** Sequence diversity of the mucABD locus in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* **152**, 3261-3269.

**Bujnicki, J. M., Prigge, S. T., Caridha, D. & Chiang, P. K. (2003).** Structure, evolution, and inhibitor interaction of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Plasmodium falciparum*. *Proteins* **52**, 624-632.

**Burton, E., Selhub, J. & Sakami, W. (1969).** The substrate specificity of 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase. *Biochem J* **111**, 793-795.

**Cai, S., Li, Q. S., Borchardt, R. T., Kuczera, K. & Schowen, R. L. (2007).** The antiviral drug ribavirin is a selective inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem* **15**, 7281-7287.

- Campodonico, V. L., Gadjeva, M., Paradis-Bleau, C., Uluer, A. & Pier, G. B. (2008).** Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends Mol Med* **14**, 120-133.
- Chandrasekaran, S. & Lalithakumari, D. (1998).** Plasmid-mediated rifampicin resistance in *Pseudomonas fluorescens*. *J Med Microbiol* **47**, 197-200.
- Chen, W., Russell, C. S., Murooka, Y. & Cosloy, S. D. (1994).** 5-Aminolevulinic acid synthesis in *Escherichia coli* requires expression of hemA. *J Bacteriol* **176**, 2743-2746.
- Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995).** Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9-14.
- Chiang, P. K. (1998).** Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther* **77**, 115-134.
- Coakley, R. D., Grubb, B. R., Paradiso, A. M., Gatzky, J. T., Johnson, L. G., Kreda, S. M., O'Neal, W. K. & Boucher, R. C. (2003).** Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 16083-16088.
- Cobb, L. M., Mychaleckyj, J. C., Wozniak, D. J. & Lopez-Boado, Y. S. (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. *J Immunol* **173**, 5659-5670.
- Coleman, F. T., Mueschenborn, S., Meluleni, G., Ray, C., Carey, V. J., Vargas, S. O., Cannon, C. L., Ausubel, F. M. & Pier, G. B. (2003).** Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1949-1954.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
- D'Argenio, D. A., Gallagher, L. A., Berg, C. A. & Manoil, C. (2001).** *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol* **183**, 1466-1471.
- Dasu, V. V., Nakada, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Kimura, K. & Itoh, Y. (2006).** Characterization and a role of *Pseudomonas aeruginosa* spermidine dehydrogenase in polyamine catabolism. *Microbiology* **152**, 2265-2272.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-6645.
- Davies, K. J., Lloyd, D. & Boddy, L. (1989).** The effect of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* **135**, 2445-2451.
- Davis, G. L., Esteban-Mur, R., Rustgi, V. & other authors (1998).** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* **339**, 1493-1499.

- Dela Vega, A. L. & Delcour, A. H. (1996).** Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J Bacteriol* **178**, 3715-3721.
- Drenkard, E. (2003).** Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* **5**, 1213-1219.
- Dunn, N. W. & Holloway, B. W. (1971).** Pleiotrophy of p-fluorophenylalanine-resistant and antibiotic hypersensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet Res* **18**, 185-197.
- Engel, J. & Balachandran, P. (2009).** Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* **12**, 61-66.
- Ernst, R. K., Yi, E. C., Guo, L., Lim, K. B., Burns, J. L., Hackett, M. & Miller, S. I. (1999).** Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **286**, 1561-1565.
- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D. & Schobert, M. (2004).** Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol* **186**, 4596-4604.
- Field, T. R., White, A., Elborn, J. S. & Tunney, M. M. (2005).** Effect of oxygen limitation on the in vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* grown planktonically and as biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**, 677-687.
- Firoved, A. M., Boucher, J. C. & Deretic, V. (2002).** Global genomic analysis of AlgU (sigma(E))-dependent promoters (sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for inflammatory processes in cystic fibrosis. *J Bacteriol* **184**, 1057-1064.
- Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T. & Solas, D. (1991).** Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**, 767-773.
- Fogolino, M., Borne, F., Bally, M., Ball, G. & Patte, J. C. (1995).** A direct sulphydrylation pathway is used for methionine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **141** ( Pt 2), 431-439.
- Franklin, F. C. & Venables, W. A. (1976).** Biochemical, genetic, and regulatory studies of alanine catabolism in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **149**, 229-237.
- Gamper, M., Zimmermann, A. & Haas, D. (1991).** Anaerobic regulation of transcription initiation in the arcDABC operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173**, 4742-4750.
- Geisenberger, O., Givskov, M., Riedel, K., Hoiby, N., Tummler, B. & Eberl, L. (2000).** Production of N-acyl-L-homoserine lactones by *P. aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett* **184**, 273-278.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M. & other authors (2004).** Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**, R80.
- Ghani, M. & Soothill, J. S. (1997).** Ceftazidime, gentamicin, and rifampicin, in combination, kill biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol* **43**, 999-1004.

- Giardina, G., Rinaldo, S., Johnson, K. A., Di Matteo, A., Brunori, M. & Cutruzzola, F. (2008).** NO sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: structure of the transcriptional regulator DNR. *J Mol Biol* **378**, 1002-1015.
- Gibson, R. L., Burns, J. L. & Ramsey, B. W. (2003).** Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 918-951.
- Gooderham, W. J. & Hancock, R. E. (2009).** Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 279-294.
- Govan, J. R. (1975).** Mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: the influence of culture medium on the stability of mucus production. *J Med Microbiol* **8**, 513-522.
- Grasemann, H., Ioannidis, I., Tomkiewicz, R. P., de Groot, H., Rubin, B. K. & Ratjen, F. (1998).** Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. *Arch Dis Child* **78**, 49-53.
- Guest, J. R., Friedman, S., Foster, M. A., Tejerina, G. & Woods, D. D. (1964).** Transfer of the methyl group from N5-methyltetrahydrofolates to homocysteine in *Escherichia coli*. *Biochem J* **92**, 497-504.
- Haas, D. (2006).** Cost of cell-cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: why it can pay to be signal-blind. *Nat Rev Microbiol* **4**, 562; author reply 562.
- Hancock, R. E., Mutharia, L. M., Chan, L., Darveau, R. P., Speert, D. P. & Pier, G. B. (1983).** *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun* **42**, 170-177.
- Hasegawa, N., Arai, H. & Igarashi, Y. (2001).** Two c-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the nir gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 1223-1230.
- Hassett, D. J. (1996).** Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J Bacteriol* **178**, 7322-7325.
- Hassett, D. J., Cuppoletti, J., Trapnell, B. & other authors (2002).** Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 1425-1443.
- Hassett, D. J., Sutton, M. D., Schurr, M. J., Herr, A. B., Caldwell, C. C. & Matu, J. O. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends Microbiol* **17**, 130-138.
- Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W. & Wiedemann, B. (2007).** Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 4062-4070.

- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B. & other authors (2003).** Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *Embo J* **22**, 3803-3815.
- Heurlier, K., Denervaud, V. & Haas, D. (2006).** Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* **296**, 93-102.
- Heydorn, A., Ersboll, B. K., Hentzer, M., Parsek, M. R., Givskov, M. & Molin, S. (2000).** Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology* **146** ( Pt 10), 2409-2415.
- Hill, D., Rose, B., Pajkos, A. & other authors (2005).** Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* **43**, 5085-5090.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. & Schweizer, H. P. (1998).** A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**, 77-86.
- Huang, H. & Hancock, R. E. (1993).** Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**, 7793-7800.
- Huang, Q., Ding, W. & Wei, M. X. (2008).** Comparative analysis of common CFTR polymorphisms poly-T, TG-repeats and M470V in a healthy Chinese population. *World J Gastroenterol* **14**, 1925-1930.
- Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A. & Vingron, M. (2002).** Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* **18 Suppl 1**, S96-104.
- Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A. & Vingron, M. (2003).** Parameter estimation for the calibration and variance stabilization of microarray data. *Stat Appl Genet Mol Biol* **2**, Article3.
- Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B. & Speed, T. P. (2003a).** Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* **31**, e15.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. & Speed, T. P. (2003b).** Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-264.
- Itoh, Y. & Nakada, Y. (2004).** *Pseudomonas*. New York: Kluwer Academic Plenum Publishers.
- Jalal, S., Ciofu, O., Hoiby, N., Gotoh, N. & Wretling, B. (2000).** Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 710-712.
- Jin, D. J. & Gross, C. A. (1988).** Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* **202**, 45-58.



**Jones, K. L., Hegab, A. H., Hillman, B. C., Simpson, K. L., Jinkins, P. A., Grisham, M. B., Owens, M. W., Sato, E. & Robbins, R. A. (2000).** Elevation of nitrotyrosine and nitrate concentrations in cystic fibrosis sputum. *Pediatr Pulmonol* **30**, 79-85.

**Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lau, J. Y. & Lipkin, W. I. (2000).** Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis* **182**, 1214-1217.

**Juan, C., Macia, M. D., Gutierrez, O., Vidal, C., Perez, J. L. & Oliver, A. (2005).** Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4733-4738.

**Juhas, M., Eberl, L. & Tummeler, B. (2005).** Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **7**, 459-471.

**Kang, Y., Nguyen, D. T., Son, M. S. & Hoang, T. T. (2008).** The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the fadBA5 beta-oxidation operon. *Microbiology* **154**, 1584-1598.

**Katzen, H. M. & Buchanan, J. M. (1965).** Enzymatic Synthesis of the Methyl Group of Methionine. 8. Repression-Derepression, Purification, and Properties of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase from *Escherichia Coli*. *J Biol Chem* **240**, 825-835.

**Kawasaki, S., Arai, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1995).** Sequencing and characterization of the downstream region of the genes encoding nitrite reductase and cytochrome c-551 (nirSM) from *Pseudomonas aeruginosa*: identification of the gene necessary for biosynthesis of heme d1. *Gene* **167**, 87-91.

**Keller, L. & Surette, M. G. (2006).** Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **4**, 249-258.

**Kilbourn, J. P. (1978).** Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis. *Lancet* **1**, 334.

**Kim, J., Hahn, J. S., Franklin, M. J., Stewart, P. S. & Yoon, J. (2009).** Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* **63**, 129-135.

**Klawonn, F., Choi, C., Benkert, B., Thielen, B., Münch, R., Schobert, M., Schomburg, D. & Jahn, D. (2007).** A Likelihood Ratio Test for Differential Metabolic Profiles in Multiple Intensity Measurements. In *Knowledge-Based Intelligent Information and Engineering Systems*, pp. 485-492. Edited by B. Apolloni, R. J. Howlett & L. Jain. Berlin: Springer Verlag.

**Kruszewska, H., Zareba, T. & Tyski, S. (2002).** Search of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. *Acta Pol Pharm* **59**, 436-439.

- Kwon, D. H. & Lu, C. D. (2006a).** Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1615-1622.
- Kwon, D. H. & Lu, C. D. (2006b).** Polyamines increase antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1623-1627.
- Kwon, D. H. & Lu, C. D. (2007).** Polyamine effects on antibiotic susceptibility in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2070-2077.
- Lam, J., Chan, R., Lam, K. & Costerton, J. W. (1980).** Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* **28**, 546-556.
- Lambert, P. A. (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* **95 Suppl 41**, 22-26.
- Landry, R. M., An, D., Hupp, J. T., Singh, P. K. & Parsek, M. R. (2006).** Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol* **59**, 142-151.
- Lau, G. W., Hassett, D. J. & Britigan, B. E. (2005).** Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Microbiol* **13**, 389-397.
- Leech, A. J., Sprinkle, A., Wood, L., Wozniak, D. J. & Ohman, D. E. (2008).** The NtrC family regulator AlgB, which controls alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, binds directly to the algD promoter. *J Bacteriol* **190**, 581-589.
- Lessie, T. G. & Phibbs, P. V., Jr. (1984).** Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annu Rev Microbiol* **38**, 359-388.
- Li, C. & Hung Wong, W. (2001).** Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0032.
- Li, C. & Wong, W. H. (2001).** Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 31-36.
- Li, J. M., Brathwaite, O., Cosloy, S. D. & Russell, C. S. (1989).** 5-Aminolevulinic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**, 2547-2552.
- Li, X. Z., Nikaido, H. & Poole, K. (1995).** Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 1948-1953.
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. & Ausubel, F. M. (2006).** An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2833-2838.
- Linnane, S. J., Keatings, V. M., Costello, C. M., Moynihan, J. B., O'Connor, C. M., Fitzgerald, M. X. & McLoughlin, P. (1998).** Total sputum nitrate plus nitrite is raised

during acute pulmonary infection in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **158**, 207-212.

**Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R. & Lockhart, D. J. (1999).** High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **21**, 20-24.

**Livermore, D. M. (1995).** beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**, 557-584.

**Livermore, D. M. (2002).** Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* **34**, 634-640.

**Low, D. A., Weyand, N. J. & Mahan, M. J. (2001).** Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infect Immun* **69**, 7197-7204.

**Lozada-Ramirez, J. D., Martinez-Martinez, I., Sanchez-Ferrer, A. & Garcia-Carmona, F. (2008).** S-adenosylhomocysteine hydrolase from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, overexpression, purification, and biochemical characterization. *J Mol Microbiol Biotechnol* **15**, 277-286.

**Lu, C. D., Winteler, H., Abdelal, A. & Haas, D. (1999).** The ArgR regulatory protein, a helper to the anaerobic regulator ANR during transcriptional activation of the *arcD* promoter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**, 2459-2464.

**Luthi, E., Baur, H., Gamper, M., Brunner, F., Villeval, D., Mercenier, A. & Haas, D. (1990).** The *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* contains an additional gene, *arcD*, encoding a membrane protein. *Gene* **87**, 37-43.

**Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2000).** Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**, 1051-1060.

**Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2002).** Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 194-222.

**Lynch, M. J., Drusano, G. L. & Mobley, H. L. (1987).** Emergence of resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **31**, 1892-1896.

**Macfarlane, E. L., Kwasnicka, A., Ochs, M. M. & Hancock, R. E. (1999).** PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol Microbiol* **34**, 305-316.

**Macfarlane, E. L., Kwasnicka, A. & Hancock, R. E. (2000).** Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-phoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology* **146** ( Pt 10), 2543-2554.

**Macia, M. D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Perez, J. L. & Oliver, A. (2005).** Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3382-3386.

- Mah, T. F. & O'Toole, G. A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**, 34-39.
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E. & Speert, D. P. (1994).** Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **62**, 596-605.
- Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H., Govan, J. R., Holloway, B. W. & Deretic, V. (1993).** Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8377-8381.
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C. & other authors (2008).** Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3100-3105.
- Matsui, H., Wagner, V. E., Hill, D. B. & other authors (2006).** A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18131-18136.
- Moreau-Marquis, S., Stanton, B. A. & O'Toole, G. A. (2008).** *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm Pharmacol Ther* **21**, 595-599.
- Mori, N., Oishi, K., Sar, B., Mukaida, N., Nagatake, T., Matsushima, K. & Yamamoto, N. (1999).** Essential role of transcription factor nuclear factor-kappaB in regulation of interleukin-8 gene expression by nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory epithelial cells. *Infect Immun* **67**, 3872-3878.
- Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B. & Costerton, J. W. (1985).** Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* **27**, 619-624.
- O'Sullivan, B. P. & Freedman, S. D. (2009).** Cystic fibrosis. *Lancet* **373**, 1891-1904.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49-79.
- Ochs, M. M., McCusker, M. P., Bains, M. & Hancock, R. E. (1999).** Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1085-1090.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F. & Blazquez, J. (2000).** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**, 1251-1254.
- Oliver, A., Baquero, F. & Blazquez, J. (2002).** The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol* **43**, 1641-1650.
- Palleroni, N. (1992).** Introduction in the family of *Pseudomonadaceae*. In *Prokaryotes*, pp. 3071-2085.

- Palmer, K. L., Mashburn, L. M., Singh, P. K. & Whiteley, M. (2005).** Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *J Bacteriol* **187**, 5267-5277.
- Palmer, K. L., Aye, L. M. & Whiteley, M. (2007a).** Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. *J Bacteriol* **189**, 8079-8087.
- Palmer, K. L., Brown, S. A. & Whiteley, M. (2007b).** Membrane-bound nitrate reductase is required for anaerobic growth in cystic fibrosis sputum. *J Bacteriol* **189**, 4449-4455.
- Philippot, L. & Hojberg, O. (1999).** Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1446**, 1-23.
- Pier, G. B., Grout, M. & Zaidi, T. S. (1997).** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12088-12093.
- Pier, G. B. (2000).** Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8822-8828.
- Platt, M. D., Schurr, M. J., Sauer, K. & other authors (2008).** Proteomic, microarray, and signature-tagged mutagenesis analyses of anaerobic *Pseudomonas aeruginosa* at pH 6.5, likely representing chronic, late-stage cystic fibrosis airway conditions. *J Bacteriol* **190**, 2739-2758.
- Plotkowski, M. C., Pova, H. C., Zahm, J. M., Lizard, G., Pereira, G. M., Tournier, J. M. & Puchelle, E. (2002).** Early mitochondrial dysfunction, superoxide anion production, and DNA degradation are associated with non-apoptotic death of human airway epithelial cells induced by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 617-626.
- Poole, K. (2005a).** Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **56**, 20-51.
- Poole, K. (2005b).** Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 479-487.
- Potter, L. C., Millington, P., Griffiths, L., Thomas, G. H. & Cole, J. A. (1999).** Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: does Nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth? *Biochem J* **344 Pt 1**, 77-84.
- Quäck, N. (2005).** Proteomanalyse des anaeroben regulatorischen Netzwerkes von *Pseudomonas aeruginosa*. In *Institut für Mikrobiologie*. Braunschweig: TU Braunschweig.
- Quinton, P. M. (2008).** Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet* **372**, 415-417.

**Rahme, L. G., Tan, M. W., Le, L., Wong, S. M., Tompkins, R. G., Calderwood, S. B. & Ausubel, F. M. (1997).** Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13245-13250.

**Ratjen, F. & Döring, G. (2003).** Cystic fibrosis. *Lancet* **361**, 681-689.

**Rehm, H. (2000).** In *Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics*: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

**Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B. & other authors (1989).** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.

**Romero, P. & Karp, P. (2003).** PseudoCyc, a pathway-genome database for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**, 230-239.

**Sahu, S. & Lynn, W. S. (1978).** Lipid composition of sputum from patients with asthma and patients with cystic fibrosis. *Inflammation* **3**, 27-36.

**Sambrook, J. & Russel, D. (2001).** *Molecular cloning: A Laboratory Manuel*.

**Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.

**Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**, 1140-1154.

**Sawers, R. G. (1991).** Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 1469-1481.

**Schmidt, K. D., Tummler, B. & Romling, U. (1996).** Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J Bacteriol* **178**, 85-93.

**Schobert, M. (1999).** Molekulargenetische Untersuchungen zum Ethanol-oxidierenden System in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Fachbereich 15 - Lebenswissenschaft und Biotechnologie*. Berlin: TU Berlin.

**Schreiber, K., Boes, N., Eschbach, M., Jaensch, L., Wehland, J., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Hentzer, M. & Schobert, M. (2006).** Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *J Bacteriol* **188**, 659-668.

**Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert, M. & Jahn, D. (2007).** The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J Bacteriol* **189**, 4310-4314.

**Schurr, M. J., Yu, H., Martinez-Salazar, J. M., Boucher, J. C. & Deretic, V. (1996).** Control of AlgU, a member of the sigma E-like family of stress sigma factors, by the nega-

tive regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J Bacteriol* **178**, 4997-5004.

**Schweizer, H. P. & Po, C. (1994).** Cloning and nucleotide sequence of the *glpD* gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**, 2184-2193.

**Schweizer, H. P. (2003).** Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* **2**, 48-62.

**Sganga, M. W., Aksamit, R. R., Cantoni, G. L. & Bauer, C. E. (1992).** Mutational and nucleotide sequence analysis of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Rhodobacter capsulatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6328-6332.

**Sharma, V., Noriega, C. E. & Rowe, J. J. (2006).** Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **72**, 695-701.

**Shaver, C. M. & Hauser, A. R. (2004).** Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* **72**, 6969-6977.

**Silvestrini, M. C., Falcinelli, S., Ciabatti, I., Cutruzzola, F. & Brunori, M. (1994).** *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase (or cytochrome oxidase): an overview. *Biochimie* **76**, 641-654.

**Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983).** A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784 - 791.

**Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J. & Greenberg, E. P. (2000).** Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**, 762-764.

**Smith, A. L., Redding, G., Doershuk, C. & other authors (1988).** Sputum changes associated with therapy for endobronchial exacerbation in cystic fibrosis. *J Pediatr* **112**, 547-554.

**Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z. & other authors (2006).** Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8487-8492.

**Son, M. S., Matthews, W. J., Jr., Kang, Y., Nguyen, D. T. & Hoang, T. T. (2007).** In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* **75**, 5313-5324.

**Spoering, A. L. & Lewis, K. (2001).** Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* **183**, 6746-6751.

**Spoering, A. L., Vulic, M. & Lewis, K. (2006).** GlpD and PlsB participate in persister cell formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 5136-5144.

**Sriramulu, D. D., Lunsdorf, H., Lam, J. S. & Romling, U. (2005).** Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol* **54**, 667-676.

**Stewart, P. S. (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* **292**, 107-113.

**Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L. & other authors (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.

**Strelkov, S., von Elstermann, M. & Schomburg, D. (2004).** Comprehensive analysis of metabolites in *Corynebacterium glutamicum* by gas chromatography/mass spectrometry. *Biol Chem* **385**, 853-861.

**Tan, M. W., Rahme, L. G., Sternberg, J. A., Tompkins, R. G. & Ausubel, F. M. (1999).** *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2408-2413.

**Tanaka, N., Nakanishi, M., Kusakabe, Y., Shiraiwa, K., Yabe, S., Ito, Y., Kitade, Y. & Nakamura, K. T. (2004).** Crystal structure of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* **343**, 1007-1017.

**Taylor, R. F., Hodson, M. E. & Pitt, T. L. (1992).** Auxotrophy of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett* **71**, 243-246.

**Taylor, R. F., Hodson, M. E. & Pitt, T. L. (1993).** Adult cystic fibrosis: association of acute pulmonary exacerbations and increasing severity of lung disease with auxotrophic mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Thorax* **48**, 1002-1005.

**Thanbichler, M., Neuhiel, B. & Bock, A. (1999).** S-methylmethionine metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 662-665.

**Thoma, S. & Schobert, M. (2009).** An improved *Escherichia coli* donor strain for diparental mating. *FEMS Microbiol Lett* **294**, 127-132.

**Tiburzi, F., Imperi, F. & Visca, P. (2008).** Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **67**, 213-227.

**Toyofuku, M., Nomura, N., Fujii, T., Takaya, N., Maseda, H., Sawada, I., Nakajima, T. & Uchiyama, H. (2007).** Quorum sensing regulates denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **189**, 4969-4972.

**Toyofuku, M., Nomura, N., Kuno, E., Tashiro, Y., Nakajima, T. & Uchiyama, H. (2008).** Influence of the *Pseudomonas* quinolone signal on denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**, 7947-7956.

**Traub, W. H., Scheidhauer, R., Leonhard, B. & Bauer, D. (1998).** Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: clusters of nosocomial cross-infection and encounter of a multiple-antibiotic resistant strain. *Chemotherapy* **44**, 243-259.



- Tribuddharat, C. & Fennewald, M. (1999).** Integron-mediated rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 960-962.
- Tunney, M. M., Field, T. R., Moriarty, T. F. & other authors (2008).** Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 995-1001.
- Unden, G., Achebach, S., Holighaus, G., Tran, H. G., Wackwitz, B. & Zeuner, Y. (2002).** Control of FNR function of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub> and reducing conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 263-268.
- Urbanowski, M. L., Stauffer, L. T., Plamann, L. S. & Stauffer, G. V. (1987).** A new methionine locus, *metR*, that encodes a trans-acting protein required for activation of *metE* and *metH* in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **169**, 1391-1397.
- Van Alst, N. E., Picardo, K. F., Iglewski, B. H. & Haidaris, C. G. (2007).** Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation, and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **75**, 3780-3790.
- Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1998).** Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* **4**, 551-560.
- Van Eldere, J. (2003).** Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *J Antimicrob Chemother* **51**, 347-352.
- Vander Wauven, C., Pierard, A., Kley-Raymann, M. & Haas, D. (1984).** *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* **160**, 928-934.
- Villas-Boas, S. G., Hojer-Pedersen, J., Akesson, M., Smedsgaard, J. & Nielsen, J. (2005).** Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast* **22**, 1155-1169.
- Wachino, J., Shibayama, K., Kurokawa, H., Kimura, K., Yamane, K., Suzuki, S., Shibata, N., Ike, Y. & Arakawa, Y. (2007).** Novel plasmid-mediated 16S rRNA *m1A1408* methyltransferase, *NpmA*, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 4401-4409.
- Wagner, V. E. & Iglewski, B. H. (2008).** *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* **35**, 124-134.
- Walters, M. C., 3rd, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. & Stewart, P. S. (2003).** Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 317-323.
- West, S. E., Schweizer, H. P., Dall, C., Sample, A. K. & Runyen-Janecky, L. J. (1994).** Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from

pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**, 81-86.

**Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. (2002).** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487.

**Williams, H. D., Zlosnik, J. E. & Ryall, B. (2007).** Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microb Physiol* **52**, 1-71.

**Winsor, G. L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M. D., Hancock, R. E. & Brinkman, F. S. (2009).** *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **37**, D483-488.

**Winstanley, C. & Fothergill, J. L. (2009).** The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol Lett* **290**, 1-9.

**Winzer, K., Hardie, K. R., Burgess, N. & other authors (2002).** LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology* **148**, 909-922.

**Withers, H., Swift, S. & Williams, P. (2001).** Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 186-193.

**Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M. & other authors (2002).** Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* **109**, 317-325.

**Yaginuma, S., Muto, N., Tsujino, M., Sudate, Y., Hayashi, M. & Otani, M. (1981).** Studies on neplanocin A, new antitumor antibiotic. I. Producing organism, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **34**, 359-366.

**Yamada, T., Komoto, J., Lou, K., Ueki, A., Hua, D. H., Sugiyama, K., Takata, Y., Ogawa, H. & Takusagawa, F. (2007).** Structure and function of eritadenine and its 3-deaza analogues: potent inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase and hypocholesterolemic agents. *Biochem Pharmacol* **73**, 981-989.

**Yang, L., Haagensen, J. A., Jelsbak, L., Johansen, H. K., Sternberg, C., Hoiby, N. & Molin, S. (2008).** In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *J Bacteriol* **190**, 2767-2776.

**Ye, R. W., Haas, D., Ka, J. O., Krishnapillai, V., Zimmermann, A., Baird, C. & Tiedje, J. M. (1995).** Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. *J Bacteriol* **177**, 3606-3609.

**Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato, H. & Arakawa, Y. (2003).** Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* **362**, 1888-1893.

**Yoneyama, H. & Nakae, T. (1993).** Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 2385-2390.

- Yoneyama, H., Ocaktan, A., Tsuda, M. & Nakae, T. (1997).** The role of mex-gene products in antibiotic extrusion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **233**, 611-618.
- Yoon, S. S., Hennigan, R. F., Hilliard, G. M. & other authors (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* **3**, 593-603.
- Yoon, S. S., Coakley, R., Lau, G. W. & other authors (2006).** Anaerobic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by acidified nitrite derivatives under cystic fibrosis airway conditions. *J Clin Invest* **116**, 436-446.
- Yoon, S. S., Karabulut, A. C., Lipscomb, J. D. & other authors (2007).** Two-pronged survival strategy for the major cystic fibrosis pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*, lacking the capacity to degrade nitric oxide during anaerobic respiration. *Embo J* **26**, 3662-3672.
- Zumft, W. G. (1997).** Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 533-616.

## 6 Anhang

Tab. 14: Ergebnisse der Transkriptomanalyse Spermidin-regulierter Gene in ASM. *P. aeruginosa* PAO1 wurde unter anaeroben Bedingungen in Koloniebiofilmen auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat oder ASM-Agar mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen bis zur entsprechenden Stationärphase. Dargestellt ist die n-fache Veränderung der Genexpression. +2 bedeutet, dass das entsprechende Gen in ASM 2-fach stärker induziert wurde als in LB.

PA Nummer	Gen	Beschreibung	n-fache Veränderung
<b><i>oprH-phoPQ</i> Operon</b>			
PA1178	<i>oprH</i>	Protein H der äußeren Membran	+ 1,9
PA1179	<i>phoP</i>	Zweikomponentensystem Regulator PhoP	+ 1,4
PA1180	<i>phoQ</i>	Zweikomponentensystem Sensor PhoQ	+ 1,2
<b><i>arnBCADTEF</i> Operon</b>			
PA3552		Konserviertes hypothetisches Protein	+ 1,2
PA3553		Mögliche Glykosyltransferase	+ 1,3
PA3554		Konserviertes hypothetisches Protein	+ 1,4
PA3555		Konserviertes hypothetisches Protein	+ 1,0
PA3556	<i>arnT</i>	L-Ara4N Transferase ArnT der inneren Membran	+ 1,2
PA3557		Konserviertes hypothetisches Protein	+ 1,2
PA3558		Hypothetisches Protein	+ 1,2
PA3559		Mögliche Nukleotidzucker-Dehydrogenase	+ 1,3

Tab. 15: Ergebnisse der Transkriptomanalyse aller signifikant regulierten Gene die in ASM unterschiedlich reguliert wurden. *P. aeruginosa* PAO1 wurde unter anaeroben Bedingungen in Koloniebiofilmen auf LB-Agar mit 50 mM Nitrat oder ASM-Agar mit physiologischen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen bis zur entsprechenden Stationärphase. Dargestellt ist die n-fache Veränderung der Genexpression. +2 bedeutet, dass das entsprechende Gen in ASM 2-fach stärker induziert wurde als in LB.

PA Nummer	Gen	Beschreibung (englisch)	Stoffwechselweg/Funktionelle Klasse (englisch)	n-fache Veränderung
PA4364		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	30,8
PA3584	<i>glpD</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Central intermediary metabolism ; Energy metabolism ;	30,5
PA2485		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	21,3
PA2486		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	20,7
PA4182		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	19,2
PA3566		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	18,7
PA1494		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	18,3
PA3126	<i>ibpA</i>	heat-shock protein IbpA	Chaperones & heat shock proteins ;	17,1
PA0737		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	15,0
PA3600		conserved hypothetical protein	Translation, post-translational modification, degradation ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	14,7
PA4181		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	13,9
PA2932	<i>morB</i>	morphinone reductase	Carbon compound catabolism ;	13,7
PA2896		probable sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcriptional regulators ;	13,1
PA3601		conserved hypothetical protein	Translation, post-translational modification, degradation ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	13,1
PA2460		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	12,1
PA1556		probable cytochrome c oxidase subunit	Energy metabolism ;	11,8
PA4365		probable transporter	Membrane proteins ; Transport of small molecules ;	11,5
PA2279	<i>arsC</i>	ArsC protein	Adaptation, Protection ; Transport of small molecules ;	10,7
PA1137		probable oxidoreductase	Putative enzymes ;	10,5
PA5053	<i>hslV</i>	heat shock protein HslV	Chaperones & heat shock proteins ;	10,1
PA2277	<i>arsR</i>	ArsR protein	Transcriptional regulators ;	10,0
PA3567		probable oxidoreductase	Putative enzymes ;	9,9
PA3531	<i>bfrB</i>	bacterioferritin	Transport of small molecules ; Adaptation, Protection ;	9,8
PA3577		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	9,6
PA1711	<i>exsE</i>	ExsE	Hypothetical, unclassified, unknown ; Transcriptional regulators ;	9,5
PA3720		hypothetical protein	Protein secretion/export apparatus ;	8,7
PA2826		probable glutathione peroxidase	Hypothetical, unclassified, unknown ;	8,7
PA1555		probable cytochrome c	Adaptation, Protection ;	8,5
PA2931		probable transcriptional regulator	Energy metabolism ;	8,4
			Transcriptional regulators ;	8,3

PA1517		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	8,3
PA3662		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	8,0
PA5304	<i>dadA</i>	D-amino acid dehydrogenase, small subunit	Energy metabolism ; Amino acid biosynthesis and metabolism ;	7,7
PA5374	<i>betI</i>	transcriptional regulator BetI	Transcriptional regulators ;	7,6
PA4657		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	7,6
PA2618		hypothetical protein	Translation, post-translational modification, degradation ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	7,5
PA4762	<i>grpE</i>	heat shock protein GrpE	DNA replication, recombination, modification and repair ; Chaperones & heat shock proteins ;	7,4
PA5446		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	7,4
PA3283		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	7,3
PA2274		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	7,3
PA3417		probable pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit	Energy metabolism ;	7,2
PA3418	<i>ldh</i>	leucine dehydrogenase	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	7,2
PA3284		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	6,8
PA3581	<i>glpF</i>	glycerol uptake facilitator protein	Transport of small molecules ;	6,8
PA2562		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	6,8
PA1557		probable cytochrome oxidase subunit (cbb3-type)	Energy metabolism ;	6,7
PA5373	<i>betB</i>	betaine aldehyde dehydrogenase	Amino acid biosynthesis and metabolism ; Adaptation, Protection	6,5
PA2100		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators	6,4
PA4710	<i>phuR</i>	Haem/Haemoglobin uptake outer membrane receptor PhuR precursor	Transport of small molecules	6,4
PA4826		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	6,3
PA3819		conserved hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	6,3
PA1710	<i>exsC</i>	ExsC, exoenzyme S synthesis protein C precursor.	Translation, post-translational modification, degradation ; Protein secretion/export apparatus ;	6,2
PA0830		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	6,2
PA1596	<i>htpG</i>	heat shock protein HtpG	Chaperones & heat shock proteins ;	6,1
PA4471		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	6,1
PA2577		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	6,0
PA0763	<i>mucA</i>	anti-sigma factor MucA	Transcriptional regulators ; Cell wall / LPS / capsule ; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ;	6,0
PA5106		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,9
PA1471		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,9
PA2895		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,9
PA2426	<i>pvdS</i>	sigma factor PvdS	Transcriptional regulators ;	5,8
PA2176		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,8
PA0424	<i>mexR</i>	multidrug resistance operon repressor MexR	Transcriptional regulators ;	5,6

PA2231	<i>pslA</i>	probable glycosyl transferase	Putative enzymes ;	5,5
PA0762	<i>algU</i>	sigma factor AlgU	Transcriptional regulators ;	5,5
PA4197		probable two-component sensor	Two-component regulatory systems ;	5,5
PA2506		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,4
PA1195		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,3
PA0596		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,3
PA0738		conserved hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,3
PA4203		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	5,2
PA2501		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,1
PA4311		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,1
PA4825	<i>mgtA</i>	Mg(2+) transport ATPase, P-type 2	Transport of small molecules ;	5,0
PA4063		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,0
PA5526		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,0
PA5054	<i>hslU</i>	heat shock protein HslU	Chaperones & heat shock proteins ;	5,0
PA2779		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	5,0
PA5372	<i>betA</i>	choline dehydrogenase	Amino acid biosynthesis and metabolism ; Adaptation, Protection	5,0
PA5212		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,9
PA5100	<i>hutU</i>	urocanase	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	4,8
PA5460		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,7
PA1300		probable sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcriptional regulators ;	4,7
PA4575		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,7
PA0714		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,7
PA4884		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,6
PA1672		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,6
PA0276		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,6
PA0134		probable guanine deaminase	Nucleotide biosynthesis and metabolism ;	4,4
PA4896		probable sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcriptional regulators ;	4,4
PA3309		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,4
PA5182		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,3
PA4625		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,3
PA2197		conserved hypothetical protein	Putative enzymes ;	4,3
PA2808	<i>ptrA</i>	two-component response repressor, PtrA	Transcriptional regulators ;	4,3
PA4658		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,2
PA4205	<i>mexG</i>	hypothetical protein	Membrane proteins ;	4,2
PA2880		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,2
PA1959	<i>bacA</i>	bacitracin resistance protein	Cell wall / LPS / capsule ; Adaptation, Protection ; Antibiotic resistance and susceptibility ;	4,1
PA0833		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,1

PA1888		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,1
PA5499	<i>np20</i>	transcriptional regulator np20	Transcriptional regulators ;	4,1
PA0125		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,1
PA5264		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ; Membrane proteins ;	4,0
PA3055		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,0
PA2175		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	4,0
PA3416		probable pyruvate dehydrogenase E1 component, beta chain	Energy metabolism ;	4,0
PA1712	<i>exsB</i>	exoenzyme S synthesis protein B	Translation, post-translational modification, degradation ; Protein secretion/export apparatus ;	3,9
PA4837		probable outer membrane protein precursor	Membrane proteins ; Transport of small molecules ;	3,9
PA2479		probable two-component response regulator	Transcriptional regulators ; Two-component regulatory systems ;	3,9
PA1713	<i>exsA</i>	transcriptional regulator ExsA	Protein secretion/export apparatus ; Transcriptional regulators ;	3,9
PA4761	<i>Dank</i>	DnaK protein	DNA replication, recombination, modification and repair ; Adaptation, Protection ; Chaperones & heat shock proteins ;	3,9
PA2104		probable cysteine synthase	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	3,9
PA0044	<i>exoT</i>	exoenzyme T	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ;	3,9
PA3412		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,8
PA0764	<i>mucB</i>	negative regulator for alginate biosynthesis MucB	Transcriptional regulators ; Cell wall / LPS / capsule ; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ;	3,8
PA3160	<i>wzz</i>	O-antigen chain length regulator	Cell wall / LPS / capsule ;	3,7
PA3582	<i>glpK</i>	glycerol kinase	Central intermediary metabolism ;	3,7
PA4655	<i>hemH</i>	ferrochelataase	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers ;	3,7
PA1283		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	3,7
PA3841	<i>exoS</i>	exoenzyme S	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ;	3,7
PA4656		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,7
PA3952		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,7
PA1864		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	3,6
PA3678		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	3,6
PA2883		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,6
PA4495		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,6
PA5502		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,6
PA4202		hypothetical protein	Putative enzymes ;	3,6
PA2024		probable ring-cleaving dioxygenase	Putative enzymes ;	3,5
PA3741		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,5
PA1194		probable amino acid permease	Membrane proteins ; Transport of small molecules ;	3,5
PA1706	<i>pcrV</i>	type III secretion protein PcrV	Protein secretion/export apparatus ;	3,4
PA3281		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,4
PA5303		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,4



PA3056		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,4
PA1676		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,4
PA2754		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,4
PA4354		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,4
PA1708	<i>popB</i>	translocator protein PopB	Protein secretion/export apparatus ;	3,3
PA3575		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,3
PA0160		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,3
PA4620		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,3
PA3572		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,3
PA4310	<i>pctB</i>	chemotactic transducer PctB	Adaptation, Protection ; Chemotaxis ;	3,3
PA2736		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,3
PA3765		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,3
PA1263		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,3
PA1746		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,3
PA2461		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,3
PA4570		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,2
PA5183		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,2
PA1296		probable 2-hydroxyacid dehydrogenase	Putative enzymes ;	3,2
PA1228		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,2
PA3282		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,1
PA4885	<i>irlR</i>	two-component response regulator	Transcriptional regulators ; Two-component regulatory systems ;	3,1
PA4196		probable two-component response regulator	Transcriptional regulators ; Two-component regulatory systems ;	3,1
PA0359		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,1
PA3732		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,1
PA3410		probable sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcriptional regulators ;	3,1
PA2827		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,1
PA3385	<i>amrZ</i>	alginate and motility regulator Z	Hypothetical, unclassified, unknown ; Motility & Attachment ; Transcriptional regulators ; Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)	3,1
PA1701		conserved hypothetical protein in type III secretion	Protein secretion/export apparatus ; Hypothetical, unclassified, unknown	3,1
PA2830	<i>htpX</i>	heat shock protein HtpX	Adaptation, Protection ;	3,1
PA2840		probable ATP-dependent RNA helicase	Transcription, RNA processing and degradation ;	3,1
PA0874		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,1
PA4574		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,1
PA2459		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,1
PA2483		conserved hypothetical protein	Putative enzymes ;	3,1
PA0876		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	3,1

PA1707	<i>pcrH</i>	regulatory protein PcrH	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Protein secretion/export apparatus ;	3,1
PA2561		probable chemotaxis transducer	Adaptation, Protection ; Chemotaxis ;	3,0
PA2127		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,0
PA3268		probable TonB-dependent receptor	Membrane proteins ; Transport of small molecules ;	3,0
PA3351	<i>flgM</i>	FlgM	Transcriptional regulators ;	3,0
PA4288		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	3,0
PA4387		conserved hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	3,0
PA1930		probable chemotaxis transducer	Adaptation, Protection ; Chemotaxis ;	3,0
PA1382		probable type II secretion system protein	Protein secretion/export apparatus ;	2,9
PA1542		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA3415		probable dihydrolipoamide acetyltransferase	Energy metabolism ;	2,9
PA1714	<i>exsD</i>	ExsD	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA4108		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA2884		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA2761		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA2652		probable chemotaxis transducer	Adaptation, Protection ; Chemotaxis ;	2,9
PA2569		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA2116		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA2937		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA3842		probable chaperone	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Chaperones & heat shock proteins ;	2,9
PA2021		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA3788		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA1753		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA0858		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,9
PA3460		probable acetyltransferase	Putative enzymes ;	2,9
PA5105	<i>hutC</i>	histidine utilization repressor HutC	Transcriptional regulators ;	2,8
PA1747		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,8
PA1414		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,8
PA0445		probable transposase	Related to phage, transposon, or plasmid ;	2,8
PA2218		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,8
PA5500	<i>znuC</i>	zinc transport protein ZnuC	Transport of small molecules ;	2,7
PA0890	<i>aotM</i>	arginine/ornithine transport protein AotM	Membrane proteins ; Transport of small molecules ;	2,7
PA3120	<i>leuD</i>	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	2,7
PA2082		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	2,7
PA4726	<i>cbrB</i>	two-component response regulator CbrB	Two-component regulatory systems ; Transcriptional regulators ; Carbon compound catabolism ;	2,7

PA4619		probable c-type cytochrome	Putative enzymes ;	2,7
PA4156		probable TonB-dependent receptor	Transport of small molecules ;	2,7
PA3585	<i>glpM</i>	membrane protein GlpM	Membrane proteins ; Transport of small molecules ;	2,7
PA0942		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	2,7
PA4674		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,7
PA4204		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,7
PA3352		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,7
PA3945		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,7
PA2780		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,7
PA1718	<i>pseE</i>	type III export protein PseE	Protein secretion/export apparatus ;	2,7
PA0062		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,7
PA3719		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,6
PA1289		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,6
PA3430		probable aldolase	Putative enzymes ;	2,6
PA0732		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,6
PA4309	<i>pctA</i>	chemotactic transducer PctA	Adaptation, Protection ; Chemotaxis ;	2,6
PA2567		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,6
PA1117		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,6
PA1136		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	2,6
PA1541		probable drug efflux transporter	Membrane proteins ; Transport of small molecules ;	2,6
PA0916		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,6
PA3175		probable arginase family protein	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	2,6
PA0943		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,6
PA3121	<i>leuC</i>	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	2,6
PA0165		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,6
PA3459		probable glutamine amidotransferase	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	2,6
PA3530		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,6
PA3526		probable outer membrane protein precursor	Membrane proteins ;	2,6
PA1835		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,6
PA0913	<i>mgtE</i>	probable Mg transporter MgtE	Transport of small molecules ;	2,5
PA4870		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,5
PA2440		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,5
PA4527	<i>pilC</i>	still frameshift type 4 fimbrial biogenesis protein PilC	Motility & Attachment ;	2,5
PA2232	<i>pslB</i>	probable phosphomannose isomerase/GDP-mannose pyrophosphorylase	Cell wall / LPS / capsule ;	2,5
PA4207	<i>mexI</i>	probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux transporter	Membrane proteins ; Transport of small molecules ;	2,5
PA4913		probable binding protein component of ABC transporter	Transport of small molecules ;	2,5

PA2634	<i>aceA</i>	isocitrate lyase	Putative enzymes ;	2,5
PA1175	<i>napD</i>	NapD protein of periplasmic nitrate reductase	Energy metabolism ;	2,5
		Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux	Transport of small molecules ; Antibiotic resistance and susceptibility ;	2,5
PA0425	<i>mexA</i>	membrane fusion protein MexA precursor	Membrane proteins ; Transport of small molecules ;	2,5
PA2219	<i>opdE</i>	membrane protein OpdE	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,5
PA3580		conserved hypothetical protein	DNA replication, recombination, modification and repair ;	2,5
PA4760	<i>dnaJ</i>	DnaJ protein	Chaperones & heat shock proteins ; Adaptation, Protection ;	2,5
PA2186		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,5
PA0952		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,5
PA0554		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,5
PA2735		probable restriction-modification system protein	Putative enzymes ;	2,4
PA0310		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,4
PA1673		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,4
PA0889	<i>aotQ</i>	arginine/ornithine transport protein AotQ	Membrane proteins ; Transport of small molecules ;	2,4
PA0161		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,4
PA0506		probable acyl-CoA dehydrogenase	Putative enzymes ;	2,4
PA2388		probable transmembrane sensor	Membrane proteins ; Transcriptional regulators ;	2,4
PA2105		probable acetyltransferase	Putative enzymes ;	2,4
PA0713		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,4
PA2665		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	2,4
PA2196		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	2,4
PA2708		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,4
PA3525	<i>argG</i>	argininosuccinate synthase	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	2,4
PA1692		probable translocation protein in type III secretion	Protein secretion/export apparatus ;	2,4
PA2487		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,4
PA4616		probable c4-dicarboxylate-binding protein	Transport of small molecules ;	2,4
PA3862		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,4
PA2282		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,4
PA3353		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,4
PA3436		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,4
PA0490		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA0409	<i>pilH</i>	twitching motility protein PilH	Two-component regulatory systems ; Chemotaxis ; Motility & Attachment ;	2,3
PA3017		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA5157		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	2,3
PA2620	<i>clpA</i>	ATP-binding protease component ClpA	Translation, post-translational modification, degradation ;	2,3

PA0408	<i>pilG</i>	twitching motility protein PilG	Two-component regulatory systems ; Chemotaxis ; Motility & Attachment ;	2,3
PA5229		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA5492		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA2975	<i>rluC</i>	ribosomal large subunit pseudouridine synthase C	Transcription, RNA processing and degradation ;	2,3
PA3756		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA5302	<i>dadX</i>	catabolic alanine racemase	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	2,3
PA3796		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA2280		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA3069		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA0195	<i>pntAA</i>	putative NAD(P) transhydrogenase, subunit alpha part 1	Energy metabolism ; Transport of small molecules ;	2,3
PA5139		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA4691		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA1709	<i>popD</i>	Translocator outer membrane protein PopD precursor	Protein secretion/export apparatus ;	2,3
PA3990		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA0776		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,3
PA4645		probable purine/pyrimidine phosphoribosyl transferase	Nucleotide biosynthesis and metabolism ;	2,2
PA2621		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,2
PA3278		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,2
PA5036	<i>gltB</i>	glutamate synthase large chain precursor	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	2,2
PA1742		probable amidotransferase	Putative enzymes ;	2,2
PA1754	<i>cysB</i>	transcriptional regulator CysB	Amino acid biosynthesis and metabolism ; Transcriptional regulators ;	2,2
PA1789		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,2
PA5438		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	2,2
PA3978		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,2
PA2629	<i>purB</i>	adenylosuccinate lyase	Amino acid biosynthesis and metabolism ; Nucleotide biosynthesis and metabolism ;	2,2
PA2934		probable hydrolase	Putative enzymes ;	2,2
PA3537	<i>argF</i>	ornithine carbamoyltransferase, anabolic	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	2,2
PA0394		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,2
PA4980		probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	Putative enzymes ;	2,2
PA3731		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,2
PA3489		conserved hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,2
PA5483	<i>algB</i>	two-component response regulator AlgB	Transcriptional regulators ; Two-component regulatory systems ;	2,2
PA2247	<i>bkdA1</i>	2-oxoisovalerate dehydrogenase (alpha subunit)	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	2,2
PA1838	<i>cysI</i>	sulfite reductase	Central intermediary metabolism ;	2,2
PA0462		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,2

PA1111		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,2
PA2299		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	2,1
PA5422		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA3979		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA2523		probable two-component response regulator	Transcriptional regulators ; Two-component regulatory systems ;	2,1
PA4577		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA4588	<i>gdhA</i>	glutamate dehydrogenase	Amino acid biosynthesis and metabolism ;	2,1
PA4328		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA4803		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA1190		conserved hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA4881		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA0891		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA3365		probable chaperone	Chaperones & heat shock proteins ;	2,1
PA4542	<i>clpB</i>	ClpB protein	Translation, post-translational modification, degradation ;	2,1
PA4195		probable binding protein component of ABC transporter	Transport of small molecules ;	2,1
PA3762		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA4386	<i>groES</i>	GroES protein	Chaperones & heat shock proteins ;	2,1
PA4758	<i>carA</i>	carbamoyl-phosphate synthase small chain	Amino acid biosynthesis and metabolism ; Nucleotide biosynthesis and metabolism ;	2,1
PA0892	<i>aotP</i>	arginine/ornithine transport protein AotP	Transport of small molecules ;	2,1
PA2956		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA3461		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA1528	<i>zipA</i>	cell division protein ZipA	Cell division ;	2,1
PA2606		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA3306		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA4596		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	2,1
PA0805		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA1241		probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators ;	2,1
PA4746		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA4660	<i>phr</i>	deoxyribodipyrimidine photolyase	DNA replication, recombination, modification and repair ;	2,1
PA5356	<i>glcC</i>	transcriptional regulator GlcC	Transcriptional regulators ;	2,1
PA4017		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA0038		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA2781		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA1114		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA2233	<i>pslC</i>	probable glycosyl transferase	Putative enzymes ;	2,1
PA1729		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1
PA4711		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,1

PA4672		peptidyl-tRNA hydrolase	Translation, post-translational modification, degradation ;	2,0
PA0905	<i>rsmA</i>	RsmA, regulator of secondary metabolites	Translation, post-translational modification, degradation ;	2,0
PA2870		hypothetical protein	Nucleotide biosynthesis and metabolism ;	2,0
PA4378	<i>inaA</i>	InaA protein	Adaptation, Protection ;	2,0
PA2688	<i>pfeA</i>	Ferric enterobactin receptor, outer membrane protein PfeA precursor	Membrane proteins ; Transport of small molecules	2,0
PA4154		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,0
PA5111	<i>gloA3</i>	lactoylglutathione lyase	Central intermediary metabolism ;	2,0
PA2737		conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,0
PA2666		probable 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers ;	2,0
PA2103		probable molybdopterin biosynthesis protein MoeB	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers ;	2,0
PA0975		probable radical activating enzyme	Putative enzymes ;	2,0
PA1115		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,0
PA2298		probable oxidoreductase	Putative enzymes ;	2,0
PA0124		hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,0
PA1635	<i>kdpC</i>	potassium-transporting ATPase, C chain	Transport of small molecules ;	2,0
PA4898	<i>opdK</i>	histidine porin OpdK	Membrane proteins ; Transport of small molecules ;	2,0
PA2936		hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,0
PA4383		conserved hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown ;	2,0
PA4709		probable hemin degrading factor	Putative enzymes ;	2,0
PA3879	<i>narL</i>	two-component response regulator NarL	Energy metabolism ; Two-component regulatory systems ;	2,0
PA4270	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase beta chain	Transcription	- 2,0
PA2730		hypothetical protein		- 2,0
PA4409	<i>ftsQ</i>	cell division protein FtsQ		- 2,0
PA3478	<i>rhlB</i>	rhamnosyltransferase chain B	Cellular processes	- 2,0
PA4615		probable oxidoreductase		- 2,0
PA3820	<i>secF</i>	secretion protein SecF	Protein fate	- 2,0
PA4737		hypothetical protein		- 2,0
PA2193	<i>hcnA</i>	hydrogen cyanide synthase HcnA		- 2,0
PA1011		hypothetical protein		- 2,0
PA0572		hypothetical protein		- 2,0
PA1008	<i>bcp</i>	bacterioferritin comigratory protein		- 2,0
PA0535		probable transcriptional regulator		- 2,0
PA4427	<i>sspB</i>	stringent starvation protein B		- 2,0
PA2015	<i>liuA</i>	putative isovaleryl-CoA dehydrogenase		- 2,0
PA0139	<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxide reductase subunit C		- 2,0
PA3105	<i>xcpQ</i>	general secretion pathway protein D		- 2,0
PA1331		conserved hypothetical protein		- 2,0

PA4809	<i>fdhE</i>	FdhE protein	No Data	- 2,0
PA3471		probable malic enzyme		- 2,0
PA0760		conserved hypothetical protein		- 2,1
PA3860		probable AMP-binding enzyme	No Data	- 2,1
PA3049	<i>rmf</i>	ribosome modulation factor		- 2,1
PA1058		conserved hypothetical protein		- 2,1
PA5278	<i>dapF</i>	diaminopimelate epimerase	Amino acid biosynthesis	- 2,1
PA5128	<i>secB</i>	secretion protein SecB	Protein fate	- 2,1
PA1553		probable cytochrome c oxidase subunit	Energy metabolism	- 2,1
PA1288		probable outer membrane protein precursor		- 2,1
PA3569	<i>mmsB</i>	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	Energy metabolism	- 2,1
PA4741	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	Protein synthesis	- 2,1
PA4740	<i>pnp</i>	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Transcription	- 2,1
PA3329		hypothetical protein		- 2,1
PA1073	<i>braD</i>	branched-chain amino acid transport protein BraD		- 2,1
PA4502		probable binding protein component of ABC transporter	Transport and binding proteins	- 2,1
PA0459		probable ClpA/B protease ATP binding subunit		- 2,1
PA3475	<i>pheC</i>	cyclohexadienyl dehydratase precursor	Transport and binding proteins	- 2,1
PA5255	<i>algQ</i>	Alginate regulatory protein AlgQ		- 2,1
PA3906		hypothetical protein		- 2,1
PA4941	<i>hflC</i>	protease subunit HflC	Regulatory functions	- 2,1
PA4090		hypothetical protein		- 2,1
PA2638	<i>nuoB</i>	NADH dehydrogenase I chain B	Energy metabolism	- 2,1
PA5042	<i>pilO</i>	type 4 fimbrial biogenesis protein PilO		- 2,1
PA4402	<i>argJ</i>	glutamate N-acetyltransferase	Amino acid biosynthesis	- 2,1
PA0296		probable glutamine synthetase	Amino acid biosynthesis	- 2,1
PA5171	<i>arcA</i>	arginine deiminase	Energy metabolism	- 2,1
PA3350		hypothetical protein		- 2,1
PA4614	<i>mscL</i>	conductance mechanosensitive channel	Cellular processes	- 2,1
PA0414	<i>chpB</i>	probable methylesterase		- 2,2
PA5164	<i>rmlC</i>	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	Cell envelope	- 2,2
PA2532	<i>tpx</i>	thiol peroxidase		- 2,2
PA0446		conserved hypothetical protein		- 2,2
PA3712		hypothetical protein		- 2,2
PA0427	<i>oprM</i>	Major intrinsic multiple antibiotic resistance efflux outer membrane protein OprM precursor	Transport and binding proteins	- 2,2
PA5240	<i>trxA</i>	thioredoxin	Energy metabolism	- 2,2
PA3021		hypothetical protein		- 2,2



PA4256	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	Protein synthesis	- 2,2
PA5214	<i>gcvH1</i>	glycine cleavage system protein H1	Energy metabolism	- 2,2
PA5456		hypothetical protein		- 2,2
PA1480	<i>ccmF</i>	cytochrome C-type biogenesis protein CcmF	Energy metabolism	- 2,2
PA0176	<i>aer2</i>	aerotaxis transducer Aer2		- 2,2
PA5002		hypothetical protein		- 2,2
PA1772		probable methyltransferase	No Data	- 2,2
PA2004		conserved hypothetical protein		- 2,2
PA0413	<i>chpA</i>	still frameshift probable component of chemotactic signal transduction system	Signal transduction	- 2,2
PA0558		conserved hypothetical protein		- 2,2
PA5351	<i>rubA1</i>	Rubredoxin 1		- 2,2
PA0039		hypothetical protein		- 2,2
PA3802	<i>hisS</i>	histidyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	- 2,2
PA0837	<i>slyD</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD		- 2,2
PA3334		probable acyl carrier protein	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 2,2
PA1244		hypothetical protein		- 2,3
PA3295		probable HIT family protein		- 2,3
PA1071	<i>braF</i>	branched-chain amino acid transport protein BraF	Transport and binding proteins	- 2,3
PA0908		hypothetical protein		- 2,3
PA1777	<i>oprF</i>	Major porin and structural outer membrane porin OprF precursor		- 2,3
PA2640	<i>nuoE</i>	NADH dehydrogenase I chain E	Energy metabolism	- 2,3
PA4242	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36	Protein synthesis	- 2,3
PA2368		hypothetical protein		- 2,3
PA3022		hypothetical protein		- 2,3
PA1098	<i>fleS</i>	two-component sensor	No Data	- 2,3
PA4964	<i>parC</i>	topoisomerase IV subunit A	DNA metabolism	- 2,3
PA3644	<i>lpxA</i>	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase	Cell envelope	- 2,3
PA1453	<i>flhF</i>	flagellar biosynthesis protein FlhF	Protein fate	- 2,3
PA1287		probable glutathione peroxidase		- 2,3
PA5330		hypothetical protein		- 2,3
PA5556	<i>atpA</i>	ATP synthase alpha chain	Energy metabolism	- 2,3
PA4410	<i>ddlB</i>	D-alanine--D-alanine ligase	Cell envelope	- 2,3
PA2367		hypothetical protein		- 2,3
PA5176		conserved hypothetical protein		- 2,3
PA2446	<i>gcvH2</i>	glycine cleavage system protein H2	Energy metabolism	- 2,4
PA5253	<i>algP</i>	alginate regulatory protein AlgP		- 2,4
PA3333	<i>fabH2</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 2,4

PA1099	<i>fleR</i>	two-component response regulator	Signal transduction	- 2,4
PA1250	<i>aprI</i>	alkaline proteinase inhibitor AprI		- 2,4
PA2011	<i>liuE</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase	No Data	- 2,4
PA3391	<i>nosR</i>	regulatory protein NosR	No Data	- 2,4
PA0872	<i>phhA</i>	phenylalanine-4-hydroxylase	Energy metabolism	- 2,4
PA3907		hypothetical protein		- 2,4
PA4764	<i>fur</i>	ferric uptake regulation protein		- 2,4
PA4907		probable short-chain dehydrogenase	No Data	- 2,4
PA1119		probable outer membrane protein precursor		- 2,4
PA1969		hypothetical protein		- 2,4
PA1100	<i>fliE</i>	flagellar hook-basal body complex protein FliE	Cellular processes	- 2,4
PA2052	<i>cynS</i>	cyanate lyase	Cellular processes	- 2,4
PA4496		probable binding protein component of ABC transporter	Transport and binding proteins	- 2,4
PA3163	<i>cmk</i>	cytidylate kinase	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	- 2,4
PA1293		hypothetical protein		- 2,4
PA1583	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase (A subunit)	Energy metabolism	- 2,4
PA2147	<i>katE</i>	catalase HP11		- 2,4
PA3101	<i>xcpT</i>	general secretion pathway protein G	Protein fate	- 2,4
PA4366	<i>sodB</i>	superoxide dismutase		- 2,4
PA4701		conserved hypothetical protein		- 2,4
PA2184		conserved hypothetical protein		- 2,4
PA5312		probable aldehyde dehydrogenase	Cellular processes	- 2,4
PA4922	<i>azu</i>	azurin precursor		- 2,4
PA2994	<i>nqrF</i>	Na <sup>+</sup> -translocating NADH:quinone oxidoreductase, subunit Nqr6	Transport and binding proteins	- 2,4
PA4176	<i>ppiC2</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C2		- 2,5
PA3302		conserved hypothetical protein		- 2,5
PA3784		hypothetical protein		- 2,5
PA4661	<i>pagL</i>	Lipid A 3-O-deacylase		- 2,5
PA1048		probable outer membrane protein precursor		- 2,5
PA1584	<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase (B subunit)	Energy metabolism	- 2,5
PA4638		hypothetical protein		- 2,5
PA2190		conserved hypothetical protein		- 2,5
PA0298	<i>spuB</i>	probable glutamine synthetase	Amino acid biosynthesis	- 2,5
PA1083	<i>flgH</i>	flagellar L-ring protein precursor FlgH		- 2,5
PA2993		conserved hypothetical protein		- 2,5
PA1013	<i>purC</i>	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	- 2,5
PA4755	<i>greA</i>	transcription elongation factor GreA	Transcription	- 2,5
PA4763	<i>recN</i>	DNA repair protein RecN	DNA metabolism	- 2,5

PA2639	<i>nuoD</i>	NADH dehydrogenase I chain C,D	Energy metabolism	- 2,6
PA3639	<i>accA</i>	acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase (alpha subunit)	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 2,6
PA4557	<i>lytB</i>	LytB protein	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 2,6
PA0027		hypothetical protein		- 2,6
PA2042		probable transporter (membrane subunit)		- 2,6
PA5497	<i>nrdJa</i>	NrdJa		- 2,6
PA1070	<i>braG</i>	branched-chain amino acid transport protein BraG	Transport and binding proteins	- 2,6
PA2014	<i>liuB</i>	methylcrotonyl-CoA carboxylase, beta-subunit	Transport and binding proteins	- 2,6
PA5173	<i>arcC</i>	carbamate kinase	Energy metabolism	- 2,6
PA5359		hypothetical protein		- 2,6
PA3836		hypothetical protein		- 2,6
PA1441		hypothetical protein		- 2,6
PA3812	<i>iscA</i>	probable iron-binding protein IscA	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 2,6
PA1806	<i>fabI</i>	NADH-dependent enoyl-ACP reductase	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 2,6
PA3146	<i>wbpK</i>	probable NAD-dependent epimerase/dehydratase WbpK	Energy metabolism	- 2,6
PA0938		hypothetical protein		- 2,6
PA4124	<i>hpcB</i>	homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase	No Data	- 2,6
PA1462		probable plasmid partitioning protein		- 2,6
PA0610	<i>prtN</i>	transcriptional regulator PrtN		- 2,6
PA0565		conserved hypothetical protein	Unknown function	- 2,6
PA5001		hypothetical protein		- 2,6
PA3799		conserved hypothetical protein	No Data	- 2,6
PA0593	<i>pdxA</i>	pyridoxal phosphate biosynthetic protein PdxA	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 2,7
PA4190	<i>pqsL</i>	probable FAD-dependent monooxygenase	No Data	- 2,7
PA0005	<i>lptA</i>	lysophosphatidic acid acyltransferase, LptA	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 2,7
PA0534		conserved hypothetical protein	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 2,7
PA3395	<i>nosY</i>	NosY protein		- 2,7
PA2991	<i>sth</i>	soluble pyridine nucleotide transhydrogenase	No Data	- 2,7
PA0179		probable two-component response regulator	Signal transduction	- 2,7
PA2554		probable short-chain dehydrogenase	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 2,7
PA2172		hypothetical protein		- 2,7
PA2169		hypothetical protein	No Data	- 2,7
PA2946		hypothetical protein	No Data	- 2,7
PA0399		cystathionine beta-synthase	Amino acid biosynthesis	- 2,7
PA0400		probable cystathionine gamma-lyase	Energy metabolism	- 2,7
PA1552		probable cytochrome c	Energy metabolism	- 2,7
PA0050		hypothetical protein		- 2,7

PA2160		probable glycosyl hydrolase	Energy metabolism	- 2,8
PA3222		hypothetical protein	Transport and binding proteins	- 2,8
PA0522		hypothetical protein		- 2,8
PA3810	<i>hscA</i>	heat shock protein HscA	No Data	- 2,8
PA3152	<i>hisH2</i>	glutamine amidotransferase	Amino acid biosynthesis	- 2,8
PA3785		conserved hypothetical protein		- 2,8
PA3570	<i>mmsA</i>	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	Energy metabolism	- 2,8
PA4846	<i>aroQ1</i>	3-dehydroquinate dehydratase	Amino acid biosynthesis	- 2,8
PA5415	<i>glyA1</i>	serine hydroxymethyltransferase		- 2,8
PA1658		conserved hypothetical protein		- 2,9
PA5016	<i>aceF</i>	dihydrolipoamide acetyltransferase	Energy metabolism	- 2,9
PA1074	<i>braC</i>	branched-chain amino acid transport protein BraC		- 2,9
PA5361	<i>phoR</i>	two-component sensor PhoR	No Data	- 2,9
PA4254	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17		- 2,9
PA5168		probable dicarboxylate transporter		- 2,9
PA5220		hypothetical protein		- 2,9
PA4125	<i>hpcD</i>	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase		- 2,9
PA3801		conserved hypothetical protein		- 2,9
PA2134		hypothetical protein		- 2,9
PA3811	<i>hscB</i>	heat shock protein HscB	Protein fate	- 2,9
PA1774	<i>cfrX</i>	CfrX protein		- 2,9
PA1101	<i>fliF</i>	Flagella M-ring outer membrane protein precursor	Cellular processes	- 2,9
PA4171		probable protease	Protein fate	- 2,9
PA1571		hypothetical protein		- 3,0
PA2171		hypothetical protein		- 3,0
PA4408	<i>ftsA</i>	cell division protein FtsA	Cellular processes	- 3,0
PA3266	<i>capB</i>	cold acclimation protein B	DNA metabolism	- 3,0
PA1183	<i>dctA</i>	C4-dicarboxylate transport protein		- 3,0
PA2992		hypothetical protein		- 3,0
PA0024	<i>hemF</i>	coproporphyrinogen III oxidase, aerobic		- 3,0
PA0432	<i>sahH</i>	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	Energy metabolism	- 3,0
PA3080		hypothetical protein		- 3,0
PA0102		probable carbonic anhydrase		- 3,0
PA1609	<i>fabB</i>	beta-ketoacyl-ACP synthase I		- 3,0
PA0909		hypothetical protein		- 3,0
PA1579		hypothetical protein		- 3,0
PA3164		still frameshift 3-PHOSPHOSHIKIMATE 1-CARBOXYVINYLTRANSFERASE prephenate dehydrogenase	Amino acid biosynthesis	- 3,1

PA2623	<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase	Energy metabolism	- 3,1
PA2641	<i>nuoF</i>	NADH dehydrogenase I chain F	Energy metabolism	- 3,1
PA4217	<i>phzS</i>	flavin-containing monooxygenase	No Data	- 3,1
PA1086	<i>flgK</i>	flagellar hook-associated protein 1 FlgK	Cellular processes	- 3,1
PA0028		hypothetical protein		- 3,1
PA3914	<i>moeA1</i>	molybdenum cofactor biosynthetic protein A1	No Data	- 3,1
PA1828		probable short-chain dehydrogenase	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 3,1
PA2862	<i>lipA</i>	lactonizing lipase precursor		- 3,1
PA3331		cytochrome P450		- 3,1
PA5271		hypothetical protein		- 3,1
PA0647		hypothetical protein		- 3,1
PA1775	<i>cmpX</i>	conserved cytoplasmic membrane protein, CmpX protein		- 3,1
PA1843	<i>metH</i>	methionine synthase	Amino acid biosynthesis	- 3,1
PA0792	<i>prpD</i>	propionate catabolic protein PrpD	No Data	- 3,1
PA0122		conserved hypothetical protein		- 3,1
PA0084		conserved hypothetical protein		- 3,1
PA3643	<i>lpxB</i>	lipid A-disaccharide synthase	Cell envelope	- 3,2
PA1130	<i>rhlC</i>	rhamnosyltransferase 2	Cell envelope	- 3,2
PA1338	<i>ggt</i>	gamma-glutamyltranspeptidase precursor	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 3,2
PA5496	<i>nrdJb</i>	NrdJb		- 3,2
PA0429		hypothetical protein		- 3,2
PA4015		conserved hypothetical protein		- 3,2
PA3813	<i>iscU</i>	probable iron-binding protein IscU	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 3,2
PA2552		probable acyl-CoA dehydrogenase		- 3,2
PA0870	<i>phhC</i>	aromatic amino acid aminotransferase		- 3,2
PA0456		probable cold-shock protein	DNA metabolism	- 3,3
PA5172	<i>arcB</i>	ornithine carbamoyltransferase, catabolic	Amino acid biosynthesis	- 3,3
PA3396	<i>nosL</i>	NosL protein		- 3,3
PA3079		hypothetical protein	Transport and binding proteins	- 3,3
PA1482	<i>ccmH</i>	cytochrome C-type biogenesis protein CcmH		- 3,3
PA2967	<i>fabG</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 3,3
PA1657		conserved hypothetical protein		- 3,3
PA1852		hypothetical protein		- 3,3
PA5340		hypothetical protein		- 3,3
PA1610	<i>fabA</i>	beta-hydroxydecanoyl-ACP dehydrase	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 3,3
PA3068	<i>gdhB</i>	NAD-dependent glutamate dehydrogenase		- 3,3
PA0316	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Amino acid biosynthesis	- 3,3
PA2366		conserved hypothetical protein		- 3,3

PA4025		probable ethanolamine ammonia-lyase light chain		- 3,3
PA1481	<i>ccmG</i>	cytochrome C biogenesis protein CcmG	Protein fate	- 3,3
PA0315		hypothetical protein		- 3,4
PA2642	<i>nuoG</i>	NADH dehydrogenase I chain G	Energy metabolism	- 3,4
PA3147	<i>wbpJ</i>	probable glycosyl transferase WbpJ		- 3,4
PA3800		conserved hypothetical protein		- 3,4
PA1842		hypothetical protein		- 3,4
PA0958	<i>oprD</i>	Basic amino acid, basic peptide and imipenem outer membrane porin OprD precursor		- 3,4
PA5555	<i>atpG</i>	ATP synthase gamma chain	Energy metabolism	- 3,5
PA5552	<i>glmU</i>	glucosamine-1-phosphate acetyltransferase/N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase	Cell envelope	- 3,5
PA2365		conserved hypothetical protein		- 3,5
PA3250		hypothetical protein		- 3,5
PA4377		hypothetical protein		- 3,6
PA3148	<i>wbpI</i>	probable UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase WbpI	Cell envelope	- 3,6
PA2443	<i>sdaA</i>	L-serine dehydratase	Energy metabolism	- 3,6
PA2968	<i>fabD</i>	malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 3,6
PA3996	<i>lis</i>	lipoate synthase	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 3,6
PA0642		hypothetical protein		- 3,6
PA2853	<i>oprI</i>	Outer membrane lipoprotein OprI precursor		- 3,6
PA4269	<i>rpoC</i>	DNA-directed RNA polymerase beta* chain		- 3,6
PA3205		hypothetical protein		- 3,6
PA0447	<i>gcdH</i>	glutaryl-CoA dehydrogenase		- 3,6
PA1483	<i>cycH</i>	cytochrome c-type biogenesis protein		- 3,6
PA5368	<i>pstC</i>	membrane protein component of ABC phosphate transporter	Transport and binding proteins	- 3,6
PA3912		conserved hypothetical protein		- 3,7
PA5339		conserved hypothetical protein	Transcription	- 3,7
PA0794		probable aconitate hydratase	No Data	- 3,7
PA3332		conserved hypothetical protein		- 3,7
PA1081	<i>flgF</i>	flagellar basal-body rod protein FlgF	Cellular processes	- 3,7
PA2587	<i>pqsH</i>	probable FAD-dependent monooxygenase	No Data	- 3,7
PA3911		conserved hypothetical protein		- 3,7
PA4810	<i>fdnI</i>	nitrate-inducible formate dehydrogenase, gamma subunit	Energy metabolism	- 3,8
PA2939		probable aminopeptidase		- 3,8
PA0730		probable transferase	No Data	- 3,8
PA1123		hypothetical protein		- 3,8
PA3866		pyocin protein		- 3,8

PA2173		hypothetical protein		- 3,8
PA2381		hypothetical protein		- 3,8
PA3394	<i>nosF</i>	NosF protein	Transport and binding proteins	- 3,9
PA0059	<i>osmC</i>	osmotically inducible protein OsmC		- 3,9
PA0796	<i>prpB</i>	carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase	No Data	- 3,9
PA0643		hypothetical protein		- 3,9
PA5174		probable beta-ketoacyl synthase		- 3,9
PA3479	<i>rhlA</i>	rhamnosyltransferase chain A		- 3,9
PA2945		conserved hypothetical protein	No Data	- 3,9
PA5461		hypothetical protein	No Data	- 3,9
PA2950		hypothetical protein		- 3,9
PA1079	<i>flgD</i>	flagellar basal-body rod modification protein FlgD		- 4,0
PA1830		hypothetical protein		- 4,0
PA0299	<i>spuC</i>	putrescine aminotransferase	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 4,0
PA4235	<i>bfrA</i>	bacterioferritin	Transport and binding proteins	- 4,1
PA4253	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	Protein synthesis	- 4,1
PA3913		probable protease		- 4,1
PA0431		hypothetical protein		- 4,1
PA2643	<i>nuoH</i>	NADH dehydrogenase I chain H		- 4,2
PA2645	<i>nuoJ</i>	NADH dehydrogenase I chain J		- 4,2
PA3150	<i>wbpG</i>	LPS biosynthesis protein WbpG		- 4,2
PA3155	<i>wbpE</i>	probable aminotransferase WbpE	Cell envelope	- 4,3
PA0300	<i>spuD</i>	polyamine transport protein		- 4,3
PA2649	<i>nuoN</i>	NADH dehydrogenase I chain N	Energy metabolism	- 4,3
PA0793		hypothetical protein	No Data	- 4,3
PA1985	<i>pqqA</i>	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein A	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 4,3
PA3870	<i>moaA1</i>	molybdopterin biosynthetic protein A1		- 4,3
PA1202		probable hydrolase		- 4,4
PA0646		hypothetical protein		- 4,4
PA0026	<i>plcB</i>	phospholipase C, PlcB		- 4,4
PA2445	<i>gcvP2</i>	glycine cleavage system protein P2	Energy metabolism	- 4,4
PA0645		hypothetical protein		- 4,4
PA1041		probable outer membrane protein precursor		- 4,5
PA0430	<i>metF</i>	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	Amino acid biosynthesis	- 4,5
PA2646	<i>nuoK</i>	NADH dehydrogenase I chain K		- 4,5
PA2647	<i>nuoL</i>	NADH dehydrogenase I chain L	Energy metabolism	- 4,5
PA3151	<i>hisF2</i>	imidazoleglycerol-phosphate synthase, cyclase subunit	Amino acid biosynthesis	- 4,6
PA0606		probable permease of ABC transporter	Transport and binding proteins	- 4,6

PA0648		hypothetical protein		- 4,6
PA0070		hypothetical protein		- 4,7
PA2553		probable acyl-CoA thiolase	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 4,7
PA2009	<i>hmgA</i>	homogentisate 1,2-dioxygenase	Energy metabolism	- 4,7
PA2644	<i>nuoI</i>	NADH Dehydrogenase I chain I	Energy metabolism	- 4,7
PA3477	<i>rhlR</i>	transcriptional regulator RhlR		- 4,8
PA0547		probable transcriptional regulator	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 4,8
PA1588	<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase beta chain	Energy metabolism	- 4,8
PA2747		hypothetical protein		- 4,8
PA3875	<i>narG</i>	respiratory nitrate reductase alpha chain	Energy metabolism	- 4,8
PA3149	<i>wbpH</i>	probable glycosyltransferase WbpH	No Data	- 4,9
PA4129		hypothetical protein		- 4,9
PA4578		hypothetical protein		- 4,9
PA4251	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5		- 5,0
PA2648	<i>nuoM</i>	NADH dehydrogenase I chain M	Energy metabolism	- 5,0
PA3924		probable medium-chain acyl-CoA ligase	No Data	- 5,0
PA5169		probable C4-dicarboxylate transporter	Transport and binding proteins	- 5,1
PA4407	<i>ftsZ</i>	cell division protein FtsZ	Cellular processes	- 5,1
PA0083		conserved hypothetical protein		- 5,1
PA3871		probable peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PpiC-type		- 5,2
PA0423	<i>pasP</i>	PasP		- 5,2
PA1341		probable permease of ABC transporter	Transport and binding proteins	- 5,2
PA1589	<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase alpha chain	Energy metabolism	- 5,3
PA3915	<i>moaB1</i>	molybdopterin biosynthetic protein B1	No Data	- 5,3
PA0567		conserved hypothetical protein		- 5,4
PA4812	<i>fdnG</i>	formate dehydrogenase-O, major subunit	Energy metabolism	- 5,4
PA4252	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	Protein synthesis	- 5,4
PA3872	<i>narI</i>	respiratory nitrate reductase gamma chain	Energy metabolism	- 5,5
PA0867		hypothetical protein		- 5,5
PA4132		conserved hypothetical protein	Energy metabolism	- 5,5
PA1150	<i>pys2</i>	pyocin S2		- 5,6
PA4500		probable binding protein component of ABC transporter	Transport and binding proteins	- 5,6
PA4023		probable transport protein	Transport and binding proteins	- 5,7
PA1077	<i>flgB</i>	flagellar basal-body rod protein FlgB	Cellular processes	- 5,7
PA4255	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	Protein synthesis	- 5,7
PA2001	<i>atoB</i>	acetyl-CoA acetyltransferase	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 5,7
PA1078	<i>flgC</i>	flagellar basal-body rod protein FlgC	Cellular processes	- 5,7
PA1082	<i>flgG</i>	flagellar basal-body rod protein FlgG	Cellular processes	- 5,8



PA2008	<i>fahA</i>	fumarylacetoacetase	Energy metabolism	- 5,8
PA0866	<i>aroP2</i>	aromatic amino acid transport protein AroP2	Transport and binding proteins	- 5,8
PA1159		probable cold-shock protein	DNA metabolism	- 5,9
PA5369	<i>pstS</i>	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein, PstS	Transport and binding proteins	- 5,9
PA3326		probable Clp-family ATP-dependent protease	Protein fate	- 5,9
PA0546	<i>metK</i>	methionine adenosyltransferase	Central intermediary metabolism	- 5,9
PA0807	<i>ampDh3</i>	AmpDh3		- 6,0
PA4778		probable transcriptional regulator	Regulatory functions	- 6,1
PA3622	<i>rpoS</i>	sigma factor RpoS	Transcription	- 6,1
PA1155	<i>nrdB</i>	NrdB, tyrosyl radical-harboring component of class Ia ribonucleotide reductase		- 6,2
PA2662		conserved hypothetical protein		- 6,2
PA2442	<i>gcvT2</i>	glycine cleavage system protein T2	Energy metabolism	- 6,2
PA3790	<i>oprC</i>	Putative copper transport outer membrane porin OprC precursor	Transport and binding proteins	- 6,2
PA1080	<i>flgE</i>	flagellar hook protein FlgE	No Data	- 6,2
PA5367	<i>pstA</i>	membrane protein component of ABC phosphate transporter	Transport and binding proteins	- 6,3
PA1871	<i>lasA</i>	LasA protease precursor		- 6,3
PA0085		conserved hypothetical protein		- 6,3
PA2444	<i>glyA2</i>	serine hydroxymethyltransferase		- 6,5
PA0640		probable bacteriophage protein		- 6,6
PA3880		conserved hypothetical protein		- 6,6
PA3221	<i>csaA</i>	CsaA protein	Protein fate	- 6,6
PA0605		probable permease of ABC transporter	Transport and binding proteins	- 6,7
PA4811	<i>fdnH</i>	nitrate-inducible formate dehydrogenase, beta subunit	No Data	- 6,8
PA5360	<i>phoB</i>	two-component response regulator PhoB	Signal transduction	- 6,8
PA0795	<i>prpC</i>	citrate synthase 2	No Data	- 6,8
PA4290		probable chemotaxis transducer		- 6,8
PA3874	<i>narH</i>	respiratory nitrate reductase beta chain	Energy metabolism	- 6,8
PA5365	<i>phoU</i>	phosphate uptake regulatory protein PhoU	Transport and binding proteins	- 6,9
PA2003	<i>bdhA</i>	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	No Data	- 7,0
PA4714		conserved hypothetical protein		- 7,0
PA0911		hypothetical protein		- 7,1
PA1339		probable ATP-binding component of ABC transporter	Transport and binding proteins	- 7,1
PA3808		conserved hypothetical protein		- 7,3
PA4236	<i>katA</i>	catalase		- 7,3
PA3809	<i>fdx2</i>	ferredoxin [2Fe-2S]	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 7,4
PA3393	<i>nosD</i>	NosD protein		- 7,6

PA0512		conserved hypothetical protein		- 7,6
PA0510		probable uroporphyrin-III c-methyltransferase	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 7,6
PA5429	<i>aspA</i>	aspartate ammonia-lyase	Energy metabolism	- 7,6
PA1854		conserved hypothetical protein		- 7,7
PA1340		probable permease of ABC transporter	Transport and binding proteins	- 7,7
PA4024	<i>eutB</i>	ethanolamine ammonia-lyase large subunit		- 7,8
PA1855		hypothetical protein		- 7,8
PA5348		probable DNA-binding protein	DNA metabolism	- 8,0
PA4847	<i>accB</i>	biotin carboxyl carrier protein (BCCP)	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 8,0
PA4848	<i>accC</i>	biotin carboxylase	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 8,1
PA5167		probable c4-dicarboxylate-binding protein	Transport and binding proteins	- 8,2
PA0910		hypothetical protein		- 8,2
PA2007	<i>maiA</i>	maleylacetoacetate isomerase	Energy metabolism	- 8,2
PA3873	<i>narJ</i>	respiratory nitrate reductase delta chain	Protein fate	- 8,2
PA0644		hypothetical protein		- 8,3
PA1585	<i>sucA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase (E1 subunit)	Energy metabolism	- 8,4
PA0514	<i>nirL</i>	heme d1 biosynthesis protein NirL		- 8,5
PA0641		probable bacteriophage protein		- 8,6
PA4130		probable sulfite or nitrite reductase	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 8,7
PA5530		probable MFS dicarboxylate transporter	Transport and binding proteins	- 8,8
PA4607		hypothetical protein		- 8,9
PA0613		hypothetical protein		- 9,0
PA4250	<i>rpsN</i>	30S ribosomal protein S14		- 9,0
PA5553	<i>atpC</i>	ATP synthase epsilon chain	Energy metabolism	- 9,0
PA3904		hypothetical protein		- 9,1
PA5366	<i>pstB</i>	ATP-binding component of ABC phosphate transporter	Transport and binding proteins	- 9,1
PA0603		probable ATP-binding component of ABC transporter	Transport and binding proteins	- 9,2
PA0511	<i>nirJ</i>	heme d1 biosynthesis protein NirJ	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 9,4
PA1432	<i>lasI</i>	autoinducer synthesis protein LasI		- 9,6
PA4134		hypothetical protein		- 9,9
PA0625		hypothetical protein		- 9,9
PA0509	<i>nirN</i>	probable c-type cytochrome		- 10,0
PA0865	<i>hpd</i>	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Energy metabolism	- 10,0
PA5445		probable coenzyme A transferase		- 10,1
PA0515		probable transcriptional regulator		- 10,3
PA1342		probable binding protein component of ABC transporter	Transport and binding proteins	- 10,3
PA2663		hypothetical protein		- 10,4
PA0631		hypothetical protein		- 10,7

PA3234		probable sodium:solute symporter	Transport and binding proteins	- 11,0
PA0630		hypothetical protein		- 11,0
PA4973	<i>thiC</i>	thiamin biosynthesis protein ThiC	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	- 11,3
PA0629		conserved hypothetical protein		- 11,3
PA0626		hypothetical protein		- 11,4
PA0604		probable binding protein component of ABC transporter		- 11,6
PA5554	<i>atpD</i>	ATP synthase beta chain	Energy metabolism	- 11,6
PA2146		conserved hypothetical protein		- 11,8
PA5481		hypothetical protein		- 11,8
PA0632		hypothetical protein		- 11,9
PA2000		probable CoA transferase, subunit B	No Data	- 12,1
PA0985		pyocin S5		- 12,2
PA1586	<i>sucB</i>	dihydrolipoamide succinyltransferase (E2 subunit)	Energy metabolism	- 12,3
PA0615		hypothetical protein		- 12,4
PA4131		probable iron-sulfur protein		- 12,4
PA3724	<i>lasB</i>	elastase LasB		- 12,5
PA0612	<i>ptrB</i>	repressor, PtrB	Mobile and extrachromosomal element functions	- 12,5
PA0513		probable transcriptional regulator		- 12,7
PA3923		hypothetical protein		- 12,9
PA5482		hypothetical protein		- 13,2
PA4525	<i>pilA</i>	type 4 fimbrial precursor PilA		- 13,7
PA3476	<i>rhlI</i>	autoinducer synthesis protein RhlI		- 13,8
PA3038		probable porin		- 14,0
PA0521		probable cytochrome c oxidase subunit		- 14,1
PA0516	<i>nirF</i>	heme d1 biosynthesis protein NirF		- 14,7
PA0639		conserved hypothetical protein		- 14,9
PA0526		hypothetical protein		- 15,2
PA0628		conserved hypothetical protein		- 15,3
PA4141		hypothetical protein		- 15,5
PA0638		probable bacteriophage protein	Mobile and extrachromosomal element functions	- 15,6
PA1999		probable CoA transferase, subunit A	No Data	- 16,0
PA0517	<i>nirC</i>	probable c-type cytochrome precursor		- 17,0
PA0634		hypothetical protein		- 17,4
PA3392	<i>nosZ</i>	nitrous-oxide reductase precursor		- 17,9
PA0520	<i>nirQ</i>	regulatory protein NirQ		- 17,9
PA0620		probable bacteriophage protein		- 18,8
PA1587	<i>lpdG</i>	lipoamide dehydrogenase-glc	No Data	- 18,9
PA0637		conserved hypothetical protein		- 19,0

PA0621		conserved hypothetical protein		- 19,0
PA0618		probable bacteriophage protein		- 19,2
PA2664	<i>fhp</i>	flavoheomprotein	Energy metabolism	- 19,6
PA0852	<i>cbpD</i>	chitin-binding protein CbpD precursor		- 20,0
PA3235		conserved hypothetical protein		- 20,1
PA0624		hypothetical protein		- 20,2
PA0614		hypothetical protein		- 20,8
PA0291	<i>oprE</i>	Anaerobically-induced outer membrane porin OprE precursor		- 21,3
PA1856		probable cytochrome oxidase subunit	Energy metabolism	- 21,3
PA3922		conserved hypothetical protein		- 21,3
PA2166		hypothetical protein		- 21,5
PA0627		conserved hypothetical protein		- 22,0
PA0616		hypothetical protein	Mobile and extrachromosomal element functions	- 22,2
PA0619		probable bacteriophage protein	Mobile and extrachromosomal element functions	- 23,0
PA0635		hypothetical protein		- 23,0
PA0636		hypothetical protein	Mobile and extrachromosomal element functions	- 23,4
PA0617		probable bacteriophage protein		- 23,5
PA0525		probable dinitrification protein NorD		- 24,0
PA1869		probable acyl carrier protein	Fatty acid and phospholipid metabolism	- 26,2
PA0623		probable bacteriophage protein	Mobile and extrachromosomal element functions	- 28,2
PA0518	<i>nirM</i>	cytochrome c-551 precursor		- 28,5
PA4738		conserved hypothetical protein		- 28,6
PA1337	<i>ansB</i>	glutaminase-asparaginase	Energy metabolism	- 29,4
PA1927	<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase	Amino acid biosynthesis	- 29,6
PA0887	<i>acsA</i>	acetyl-coenzyme A synthetase	No Data	- 29,9
PA0633		hypothetical protein		- 31,6
PA0519	<i>nirS</i>	nitrite reductase precursor		- 32,1
PA1984		probable aldehyde dehydrogenase	Cellular processes	- 32,8
PA1431	<i>rsaL</i>	regulatory protein RsaL		- 36,2
PA0622		probable bacteriophage protein		- 39,6
PA4739		conserved hypothetical protein		- 39,8
PA4133		cytochrome c oxidase subunit (cbb3-type)	Energy metabolism	- 46,5
PA0523	<i>norC</i>	nitric-oxide reductase subunit C		- 63,8
PA0524	<i>norB</i>	nitric-oxide reductase subunit B		- 74,7

## 7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Professor Dr. Dieter Jahn und Privatdozent Dr. Max Schobert für die Vergabe des spannenden Themas, der Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme der Gutachten bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Max Schobert für seine hervorragende Betreuung, seine hilfreichen Diskussionen und Anregungen sowie seinen unbegrenzten Optimismus.

Herrn Professor Dr. Ralf-R. Mendel danke ich vielmals für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Weiterhin gilt mein Dank dem Mukoviszidose e.V. für die weitgehende Finanzierung dieser Doktorarbeit im Rahmen des geförderten Forschungsprojekts „S07/05 Adaptation und Selektion von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge“.

Den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Pseudomonas“ Dr. Beatrice Benkert, Dr. Nelli Bös, Dr. Kerstin Schreiber, Julia Garbe, Annika Steen und Andrea Wesche danke ich herzlich für die sehr nette Atmosphäre im Labor und die stete Hilfsbereitschaft.

Ein herzlicher Dank geht an Claudia Schulz, Dr. Ilka Heinemann, Tanja Piekarski, Anika March, Ines Gruner und Rebekka Biedendieck für die vielen netten Abende im und außerhalb des Biozentrums. Dr. Petra Tielen sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Jahn sei vielmals für die gute Zusammenarbeit und die nette Atmosphäre im Institut gedankt.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Maurice Scheer und Dr. Claudia Pommerenke für die gute Zusammenarbeit bei der Auswertung der Affymetrix GeneChips sowie der Metabolomdaten.

Dem Institut für Bioinformatik und Biochemie der TU Braunschweig unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Dietmar Schomburg und im Besonderen seinem ehemaligen Mitarbeiter Dr. Bernhard Thielen danke ich für die Vermessung der Metabolomproben.

Unseren Kooperationspartnern vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung danke ich für die gute Zusammenarbeit. Dr. Lothar Jänsch sowie seinen Mitarbeiterinnen Undine Felgenträger und Anja Meier danke ich für die Durchführung der MALDI-TOF-Analysen. Bei Dr. Robert Geffers und Tanja Töpfer bedanke ich mich für die Analyse der Affymetrix GeneChips.

Meinen Eltern Ina und Uwe Thoma bin ich sehr dankbar für ihre immerwährende Unterstützung, ohne die ich meine Ziele sicher nicht erreicht hätte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Dr. Henner Schrapp für sein Verständnis und die vielen aufmunternden Worte. Er hat mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mir damit die nötige Unterstützung gegeben um meine Arbeit erfolgreich abschließen zu können.